

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

DEPARTAMENTOS DE PARASITOLOGÍA
Y BIOLOGÍA ANIMAL I



* 5 3 0 9 5 3 9 2 6 3 *

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE

TESIS DOCTORAL

**CARACTERIZACIÓN BIOLÓGICA DE LAS CEPAS DE
Echinococcus granulosus DE ORIGEN ESPAÑOL**

V.º B.º
F. Ponce Gordo
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE FARMACIA
DPTO. DE PARASITOLOGÍA

FRANCISCO PONCE GORDO

MADRID, 1995

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

**DEPARTAMENTOS DE PARASITOLOGÍA
Y BIOLOGÍA ANIMAL I**

TESIS DOCTORAL

**CARACTERIZACIÓN BIOLÓGICA DE LAS CEPAS DE
Echinococcus granulosus DE ORIGEN ESPAÑOL**

***Memoria que presenta para optar al grado de
Doctor, el licenciado en Ciencias Biológicas,
Francisco Ponce Gordo***

Tesis Doctoral dirigida por la Profesora Dra. Carmen Cuesta Bandera

MADRID, 1995

D. ANTONIO R. MARTÍNEZ FERNÁNDEZ, CATEDRÁTICO Y DIRECTOR DEL DEPARTAMENTO DE PARASITOLOGÍA DE LA FACULTAD DE FARMACIA DE LA UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID,

CERTIFICA: Que el licenciado en Ciencias Biológicas, Francisco Ponce Gordo, ha realizado bajo la dirección de la Prof. Dra. D^a. Carmen Cuesta Bandera, la memoria titulada: CARACTERIZACIÓN BIOLÓGICAS DE LAS CEPAS DE *Echinococcus granulosus* DE ORIGEN ESPAÑOL, para optar al grado de Doctor en Ciencias Biológicas.

Y para que así conste, expido y firmo el presente certificado en Madrid, a 30 de Mayo de 1995.



**FACULTAD DE FARMACIA
DPTO. DE PARASITOLOGIA**

Antonio R. Martínez Fernández
Antonio R. Martínez Fernández

Esta Tesis Doctoral ha sido realizada con una beca predoctoral concedida por el Rectorado de la Universidad Complutense, en su convocatoria de 1990.

El trabajo de investigación aquí recogido ha sido financiado a través de los Proyectos de Investigación 91/0150 del FISSS y PM92/0032 de la DGICYT.

- AGRADECIMIENTOS -

Son muchas las personas que, a lo largo de estos años, han puesto su granito de arena en la realización de esta Tesis Doctoral. Por no querer *extenderme mucho, por un lado, y porque no quisiera que, llegado ya al final de este camino que es la realización de una tesis, alguien se molestara por no citarle en estos agradecimientos*, hago un reconocimiento general para todos aquellos que, con sus consejos, observaciones, sugerencias y críticas, han sido siempre de gran ayuda y, de una forma u otra, han contribuido a la realización de esta memoria.

No obstante, quiero expresar de forma particular mi gratitud a la Prof. Dra. D^a Carmen Cuesta Bandera, por acogerme en su grupo de investigación y permitirme dar los primeros pasos en este complejo y a la vez sorprendente mundo de la Parasitología.

Igualmente, quiero agradecerle al Prof. Dr. Antonio R. Martínez Fernández, catedrático y director del Departamento de Parasitología de la Facultad de Farmacia de la U.C.M., el haberme adoptado entre sus doctorandos, y los valiosos consejos y la ayuda que me ha prestado durante la realización de este trabajo de investigación.

A todos, MUCHAS GRACIAS.

A mis padres.
A Isabel.

- INDICE -

	<u>Página</u>
1. INTRODUCCIÓN	1
2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	3
2.1. EL PARÁSITO: IDENTIFICACIÓN, ENCUADRE TAXONÓMICO Y BIOLOGÍA	3
2.1.1. RESEÑA HISTÓRICA	3
2.1.2. POSICIÓN TAXONÓMICA	5
2.1.3. MORFOLOGÍA	8
2.1.3.1. Adulto	8
2.1.3.2. Huevo	13
2.1.3.3. Metacestodo	14
2.1.4. CICLO BIOLÓGICO. DISTRIBUCIÓN	19
2.1.4.1. Ciclo biológico	19
2.1.4.2. Ciclos epidemiológicos	26
2.1.4.3. Distribución	29
2.1.5. PATOLOGÍA. DIAGNÓSTICO, TRATAMIENTO Y CONTROL ...	30
2.1.5.1. Patología	30
2.1.5.2. Diagnóstico	32
2.1.5.3. Tratamiento	36
2.1.5.4. Control	37
2.2. ESPECIACIÓN EN <u>Echinococcus granulosus</u>	40
2.2.1. ANTECEDENTES. TAXONOMÍA Y TERMINOLOGÍA DENTRO DEL GÉNERO <u>Echinococcus</u>	40
2.2.2. FACTORES QUE INFLUYEN EN EL FENÓMENO DE ESPECIACIÓN DE <u>Echinococcus granulosus</u>	43
2.2.3. CRITERIOS DE IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE CEPAS	46
2.2.3.1. Criterios ecológicos y epidemiológicos	49
2.2.3.1.1. Distribución geográfica	49
2.2.3.1.2. Especificidad de hospedador	49
2.2.3.2. Comportamiento y fisiología	52
2.2.3.2.1. Desarrollo <i>in vitro</i>	52
2.2.3.2.2. Desarrollo <i>in vivo</i>	55
2.2.3.3. Morfología	58

2.3.2.4. Desarrollo experimental observado	112
2.3.3. ANÁLISIS MORFOMÉTRICOS	114
2.3.3.1. Los estudios morfológicos en la sistemática de <u>Echinococcus</u>	114
2.3.3.2. Caracteres morfológicos empleados en la diferen- ciación de cepas de <u>Echinococcus granulosus</u> . Tamaño de la muestra y tratamiento estadístico	116
2.3.4. PERFILES PROTEICOS Y ANTIGÉNICOS	118
2.3.4.1. Perfiles proteicos	118
2.3.4.2. Perfiles antigénicos	121
3. OBJETIVOS	123
4. MATERIAL Y MÉTODOS	125
4.1. PROCEDIMIENTOS GENERALES	125
4.1.1. OBTENCIÓN Y TRANSPORTE DEL MATERIAL PARASI- TARIO	125
4.1.2. OBTENCIÓN DE LOS PROTOESCÓLICES	126
4.1.2.1. Disección de los quistes	126
4.1.2.2. Digestión artificial	129
4.1.2.3. Lavados post-digestión	130
4.1.3. CONTROL DE LA VIABILIDAD DE LOS PROTOESCÓLICES	130
4.1.4. RECUENTO DE PROTOESCÓLICES	131
4.2. ESTUDIOS DE CARACTERIZACIÓN DE LAS CEPAS DEL PARÁSITO	131
4.2.1. PRUEBAS <i>IN VITRO</i>	131
4.2.1.1. Cultivos en dirección vesicular	131
4.2.1.1.1. Dosificación de los protoescólices	131
4.2.1.1.2. Medio y condiciones de cultivo	132
4.2.1.1.3. Controles realizados y parámetros de desa- rrollo considerados	133
4.2.1.2. Cultivos en dirección estrobilar	134
4.2.1.2.1. Evaginación y dosificación de los pro- toescólices	134
4.2.1.2.2. Medio y condiciones de cultivo	135
4.2.1.2.3. Controles realizados y parámetros de desarrollo considerados	137

4.2.2. PRUEBAS <i>IN VIVO</i> (DESARROLLOS BIOLÓGICOS EN DIRECCIÓN VESICULAR)	138
4.2.2.1. Animales de experimentación	138
4.2.2.2. Inoculación de los animales	138
4.2.2.3. Controles realizados y parámetros de desarrollo considerados	139
4.2.3. ANÁLISIS MORFOMÉTRICOS	141
4.2.3.1. Fijación y almacenamiento de las muestras	141
4.2.3.2. Condiciones de medición	142
4.2.3.3. Tamaño muestral y parámetros considerados	142
4.2.3.4. Tratamiento de los datos. Análisis estadísticos	144
4.3. ESTUDIO DE LA INFLUENCIA DEL HOSPEDADOR	145
4.3.1. ANÁLISIS MORFOMÉTRICOS	145
4.3.2. ANÁLISIS DE PERFILES PROTEICOS Y ANTIGÉNICOS EN LÍQUIDOS HIDATÍDICOS DE QUISTES MURINOS	146
4.3.2.1. Origen, obtención y procesamiento de los líquidos hidatídicos	146
4.3.2.2. Valoración de proteínas	146
4.3.2.3. Purificación de las muestras	147
4.3.2.4. Análisis de perfiles proteicos: electroforesis (SDS-PAGE) y revelado de los geles	148
4.3.2.5. Análisis de perfiles antigénicos	149
4.3.2.5.1. Obtención de sueros hiperinmunes. Valoración de los mismos mediante ELISA e inmunoelectroforesis	149
4.3.2.5.2. Realización de la prueba (electroforesis - transferencia - inmunoreacción)	150
5. RESULTADOS	153
5.1. OBSERVACIONES PREVIAS	153
5.1.1. MUESTRAS ANIMALES	153
5.1.2. MUESTRAS HUMANAS	157
5.2. ESTUDIOS DE CARACTERIZACIÓN DE LAS CEPAS DEL PARÁSITO	171
5.2.1. PRUEBAS <i>IN VITRO</i>	171
5.2.1.1. Cultivos en dirección vesicular	171
5.2.1.1.1. Desarrollos en dirección vesicular	171
5.2.1.1.2. Desarrollos en dirección estrobilar	183

5.2.1.2. Cultivos en dirección estrobilar	193
5.2.2. PRUEBAS <i>IN VIVO</i> (DESARROLLOS BIOLÓGICOS EN DIRECCIÓN VESICULAR)	213
5.2.3. ANÁLISIS MORFOMÉTRICOS	231
5.3. ESTUDIO DE LA INFLUENCIA DEL HOSPEDADOR	250
5.3.1. ANÁLISIS MORFOMÉTRICOS	250
5.3.2. ANÁLISIS DE PERFILES PROTEICOS Y ANTIGÉNICOS EN LÍQUIDOS HIDATÍDICOS DE QUISTES MURINOS	265
5.3.2.1. Estudio de perfiles proteicos	265
5.3.2.2. Estudio de perfiles antigénicos	271
6. DISCUSIÓN	279
6.1. OBSERVACIONES PREVIAS	279
6.1.1. MUESTRAS ANIMALES	279
6.1.2. MUESTRAS HUMANAS	284
6.1.3. ESTUDIOS DE CARACTERIZACIÓN DE LAS CEPAS DEL PARÁSITO	286
6.1.4. PRUEBAS <i>IN VITRO</i>	286
6.1.4.1. Cultivos en dirección vesicular	286
6.1.4.1.1. Desarrollos en dirección vesicular	286
6.1.4.1.2. Desarrollos en dirección estrobilar	291
6.1.4.2. Cultivos en dirección estrobilar	293
6.1.5. PRUEBAS <i>IN VIVO</i> (DESARROLLOS BIOLÓGICOS EN DIRECCIÓN VESICULAR)	300
6.1.6. ANÁLISIS MORFOMÉTRICOS	305
6.2. ESTUDIO DE LA INFLUENCIA DEL HOSPEDADOR	315
6.2.1. ANÁLISIS MORFOMÉTRICOS	315
6.2.2. ANÁLISIS DE PERFILES PROTEICOS Y ANTIGÉNICOS EN LÍQUIDOS HIDATÍDICOS DE QUISTES MURINOS	318
6.2.2.1. Estudio de perfiles proteicos	318
6.2.2.2. Estudio de perfiles antigénicos	321
7. CONCLUSIONES	325
8. BIBLIOGRAFÍA	327
9. ANEXO	373

- ÍNDICE DE FIGURAS -

(Revisión Bibliográfica)	
(El parásito: identificación, encuadre taxonómico y biología)	Página
(Morfología)	
Fig. 1 - Morfología de <u>Echinococcus granulosus</u>	12
Fig. 2 - Proceso de formación de las cápsulas proligeras y protoescolices	17
(Ciclo biológico. Distribución)	
Fig. 3 - Ciclo biológico de <u>Echinococcus granulosus</u>	21
Fig. 4 - Ciclos epidemiológicos de <u>Echinococcus granulosus</u>	27
(Patología. Diagnóstico, tratamiento y control)	
Fig. 5 - Ciclo del parásito y puntos del mismo en que sería posible aplicar medidas de prevención y control	39
(Especiación en <u>Echinococcus granulosus</u>)	
(Criterios de identificación y caracterización de cepas)	
Fig. 6 - Características morfológicas de los órganos reproductores de varias cepas de <u>Echinococcus granulosus</u> (Europa y Norte de África)	61
(Revisión de las técnicas elegidas para este estudio)	
(Cultivos <i>in vitro</i>)	
Fig. 7 - Estadios evolutivos y tipos morfológicos observados en los desarrollos vesiculares <i>in vitro</i>	95
Fig. 8 - Estadios evolutivos observados en los desarrollos estrobilares	105
(Material y Métodos)	
(Procedimientos generales)	
(Obtención de los protoescolices)	
Fig. 9 - Protocolo seguido en la obtención de las muestras, y pruebas con ellas realizadas	127
(Estudios de caracterización de las cepas del parásito)	
(Análisis morfométricos)	
Fig. 10 - Medidas realizadas en los ganchos de los protoescolices	143
Fig. 11 - Procedimiento seguido en la determinación del tamaño mínimo de muestra	144
(Resultados)	
(Observaciones previas)	
(Muestras animales)	
Fig. 12 - Quiste hídático procedente de una oveja sacrificada en el matadero municipal de Madrid	159
Figs. 13, 14 - El mismo quiste anterior, abierto	159
Fig. 15 - Detalle de la arena hídática obtenida del quiste de las figuras anteriores	159
Fig. 16 - Muestra de origen bovino: quiste pulmonar	161
Fig. 17 - Muestra de origen bovino: quistes pulmonares abiertos	161
Fig. 18 - Muestra de origen equino: infestación hepática, quistes siempre estériles	163
Fig. 19 - Muestra de origen equino: infestación hepática, quistes siempre fértiles	163
Fig. 20 - Muestra de origen equino: arena hídática	165
(Muestras humanas)	
Fig. 21 - Muestra de origen humano: extracción quirúrgica de un quiste hídático adherido a asas intestinales	167
Fig. 22 - Muestra de origen humano: el quiste de la Figura 21, abierto	167
Fig. 23 - Muestra de origen humano: arena hídática obtenida del quiste de las figuras anteriores	167
Fig. 24 - Muestra de origen humano: quiste hepático abierto, mostrando su contenido	169
Fig. 25 - Muestra de origen humano: detalle del contenido del quiste de la Figura 24	169
Fig. 26 - Muestra de origen humano: quiste hepático de aspecto externo normal, pero con un contenido de consistencia gelatinosa y contaminado con sangre	169

(Estudios de caracterización de las cepas del parásito)
(Pruebas *in vitro*)

Fig. 27 - Desarrollo <i>in vitro</i> en dirección vesicular (formación de microquistes): estadio inicial	179
Fig. 28 - Desarrollo <i>in vitro</i> en dirección vesicular (formación de microquistes): inicio de endovesiculización y/o desarrollo de exovesículas	179
Fig. 29 - Desarrollo <i>in vitro</i> en dirección vesicular (formación de microquistes): vesiculización/vacuolización avanzada	179
Fig. 30 - Desarrollo <i>in vitro</i> en dirección vesicular (formación de microquistes): aparición de premicroquistes	179
Fig. 31 - Desarrollo <i>in vitro</i> en dirección vesicular (formación de microquistes): formación de membrana laminar en torno a un individuo invaginado endovesiculante	181
Fig. 32 - Desarrollo <i>in vitro</i> en dirección vesicular (formación de microquistes): membrana laminar en torno a un individuo evaginado endovesiculante	181
Fig. 33 - Desarrollo <i>in vitro</i> en dirección vesicular (formación de microquistes): membrana laminar formada en torno a la exovesícula desarrollada por un protoescólex invaginado	181
Fig. 34 - Desarrollo <i>in vitro</i> en dirección vesicular (formación de microquistes): membrana laminar formada en torno a la parte posterior de un protoescólex evaginado endovesiculante	181
Fig. 35 - Desarrollo <i>in vitro</i> en dirección vesicular (aparición de individuos segmentados): individuo presentando un notable crecimiento, con pérdida de corpúsculos calcáreos. Muestra ovina	189
Fig. 36 - Desarrollo <i>in vitro</i> en dirección vesicular (aparición de individuos segmentados): individuo con un segmento formado. Muestra ovina	189
Fig. 37 - Desarrollo <i>in vitro</i> en dirección vesicular (aparición de individuos segmentados): individuo en presegmentación, con indicios de bandedo en el estróbilo. Muestra suina	189
Fig. 38 - Desarrollo <i>in vitro</i> en dirección vesicular (aparición de individuos segmentados): aparición de individuos con un segmento formado. Muestra suina	189
Fig. 39 - Desarrollo <i>in vitro</i> en dirección vesicular (aparición de individuos segmentados): formación del segundo segmento. Muestra suina	191
Fig. 40 - Desarrollo <i>in vitro</i> en dirección vesicular (aparición de individuos segmentados): formación de los testículos, e inicio de formación del poro genital. Muestra suina	191
Fig. 41 - Desarrollo <i>in vitro</i> en dirección vesicular (aparición de individuos segmentados): desarrollo del poro genital y del cirro (poco visible). Muestra suina	191
Fig. 42 - Desarrollo <i>in vitro</i> en dirección estrobilar (estadios iniciales): formación de los canales y vesícula excretoras	201
Fig. 43 - Desarrollo <i>in vitro</i> en dirección estrobilar (estadios iniciales): crecimiento y pérdida de corpúsculos calcáreos	201
Fig. 44 - Desarrollo <i>in vitro</i> en dirección estrobilar (estadios iniciales): presegmentación (bandedo)	201
Fig. 45 - Desarrollo <i>in vitro</i> en dirección estrobilar (muestras ovinas): formación del primer segmento	203
Fig. 46 - Desarrollo <i>in vitro</i> en dirección estrobilar (muestras ovinas): formación del segundo segmento	203
Fig. 47 - Desarrollo <i>in vitro</i> en dirección estrobilar (muestras ovinas): aparición de los testículos y poro genital	203
Fig. 48 - Desarrollo <i>in vitro</i> en dirección estrobilar (muestras ovinas): formación del útero	205
Fig. 49 - Desarrollo <i>in vitro</i> en dirección estrobilar (muestras ovinas): detalle del útero	205
Fig. 50 - Desarrollo <i>in vitro</i> en dirección estrobilar (muestras suinas): desarrollo de individuos monoicoos	205
Fig. 51 - Desarrollo <i>in vitro</i> en dirección estrobilar (muestra bovina): formación del primer segmento	207
Fig. 52 - Desarrollo <i>in vitro</i> en dirección estrobilar (muestra bovina): formación del segundo segmento	207
Fig. 53 - Desarrollo <i>in vitro</i> en dirección estrobilar (muestra bovina): desarrollo de los testículos y poro genital	207
Fig. 54 - Desarrollo <i>in vitro</i> en dirección estrobilar (muestra bovina): útero formado	207

Fig. 55 - Desarrollo <i>in vitro</i> en dirección estrobilar (muestra bovina): aparición de individuos monozoicos	209
Fig. 56 - Desarrollo <i>in vitro</i> en dirección estrobilar (muestras suínas): formación del primer segmento	209
Fig. 57 - Desarrollo <i>in vitro</i> en dirección estrobilar (muestras suínas): formación del segundo segmento	209
Fig. 58 - Desarrollo <i>in vitro</i> en dirección estrobilar (muestras suínas): desarrollo de los testículos y poro genital	209
Fig. 59 - Desarrollo <i>in vitro</i> en dirección estrobilar (muestras humanas): formación del primer segmento	211
Fig. 60 - Desarrollo <i>in vitro</i> en dirección estrobilar (muestras humanas): formación del segundo segmento	211
Fig. 61 - Desarrollo <i>in vitro</i> en dirección estrobilar (muestras humanas): desarrollo de los testículos; detalle del poro genital y el cirro	201
(Pruebas <i>in vivo</i> - desarrollos biológicos en dirección vesicular)	
Fig. 62 - Desarrollo <i>in vivo</i> en dirección vesicular (H.S.E. murina): secuencia de desarrollo. Hígado de ratón mostrando pequeños nódulos blanquecinos, correspondientes a granulomas formados como reacción frente al parásito	223
Fig. 63 - Desarrollo <i>in vivo</i> en dirección vesicular (H.S.E. murina): secuencia de desarrollo. Detalle del contenido de los nódulos de la Figura 62	223
Fig. 64 - Desarrollo <i>in vivo</i> en dirección vesicular (H.S.E. murina): secuencia de desarrollo. Estadio avanzado de desarrollo vesicular de un protoescólex	223
Fig. 65 - Desarrollo <i>in vivo</i> en dirección vesicular (H.S.E. murina): secuencia de desarrollo. Formación de microquistes	225
Fig. 66 - Desarrollo <i>in vivo</i> en dirección vesicular (H.S.E. murina): secuencia de desarrollo. Detalle de un microquiste	225
Fig. 67 - Desarrollo <i>in vivo</i> en dirección vesicular (H.S.E. murina): secuencia de desarrollo. Hígado de ratón mostrando varios quistes hidatídicos de 1-2 mm de diámetro	225
Fig. 68 - Desarrollo <i>in vivo</i> en dirección vesicular (H.S.E. murina): secuencia de desarrollo. Infestación masiva, en hígado y cavidad peritoneal	227
Fig. 69 - Desarrollo <i>in vivo</i> en dirección vesicular (H.S.E. murina): secuencia de desarrollo. Detalle de la zona marcada en la Figura 68, observándose, por transparencia, pequeños puntos blancos (arena hidatídica) en el interior del quiste	227
Fig. 70 - Desarrollo <i>in vivo</i> en dirección vesicular (H.S.E. murina): secuencia de desarrollo. Detalle de la arena hidatídica obtenida del quiste indicado en la Figura 69	227
Figs. 71, 72 - Desarrollo <i>in vivo</i> en dirección vesicular (H.S.E. murina): arena hidatídica procedente de quistes equino-murinos	229
Fig. 73 - Desarrollo <i>in vivo</i> en dirección vesicular (H.S.E. murina): arena hidatídica procedente de un quiste suino-murino	229
Fig. 74 - Desarrollo <i>in vivo</i> en dirección vesicular (H.S.E. murina): arena hidatídica procedente de un quiste humano-murino	229
(Análisis morfométricos)	
Fig. 75 - Coronas de ganchos observadas en protoescólices obtenidos de muestras animales naturales procedentes de diferentes especies de hospedador intermediario	233
Fig. 76 - Coronas de ganchos observadas en protoescólices obtenidos de muestras humanas	233
(Estudio de la influencia del hospedador)	
(Análisis morfométricos)	
Fig. 77 - Coronas de ganchos observadas en protoescólices obtenidos de ratones experimentalmente infestados con protoescólices de quistes naturales de diferente origen	254
(Análisis de perfiles proteicos y antigénicos en líquidos hidatídicos de quistes murinos)	
Fig. 78 - Comparación de los patrones proteicos de muestras ovinas naturales y ovino-murinas estériles y fértiles	267

	<u>Página</u>
Fig. 79 - Comparación de los patrones proteicos de muestras equinas naturales y equino-murinas estériles y fértiles	267
Fig. 80 - Comparación de los patrones proteicos de muestras suinas naturales y suino-murinas estériles y fértiles	269
Fig. 81 - Comparación de los patrones proteicos de muestras humanas naturales y humano-murinas estériles y fértiles	269
Fig. 82 - Esquema de las principales bandas observadas en los patrones proteicos de las muestras naturales y experimentales	271
Fig. 83 - Comparación de los patrones antigénicos de muestras ovinas naturales y ovino-murinas estériles y fértiles	273
Fig. 84 - Comparación de los patrones antigénicos de muestras equinas naturales y equino-murinas estériles y fértiles	273
Fig. 85 - Comparación de los patrones antigénicos de muestras suinas naturales y suino-murinas estériles y fértiles	275
Fig. 86 - Comparación de los patrones antigénicos de muestras humanas naturales y humano-murinas estériles y fértiles	275
Fig. 87 - Esquema de las principales bandas observadas en los patrones antigénicos de las muestras naturales y experimentales	277

- ÍNDICE DE GRÁFICAS -

(Resultados)	
(Observaciones previas)	<u>Página</u>
(Muestras animales y humanas)	
Graf. 1 - Número total, viabilidad y fertilidad de las muestras parasitarias (animales y humanas) analizadas, agrupadas por especie de hospedador	154
(Estudios de caracterización de las cepas del parásito)	
(Pruebas <i>in vitro</i>)	
Gráf. 2 - Desarrollo vesicular <i>in vitro</i> - evolución según los estadios de desarrollo considerados. Muestras suinas	175
Gráf. 3 - Desarrollo vesicular <i>in vitro</i> - evolución según los estadios de desarrollo considerados. Muestras equinas	175
Gráf. 4 - Desarrollo vesicular <i>in vitro</i> - evolución según los estadios de desarrollo considerados. Muestras ovinas	176
Gráf. 5 - Desarrollo vesicular <i>in vitro</i> - evolución según los estadios de desarrollo considerados. Muestras bovinas	176
Gráf. 6 - Desarrollo vesicular <i>in vitro</i> - evolución según los estadios de desarrollo considerados. Muestras humanas	177
Gráf. 7 - Desarrollo vesicular <i>in vitro</i> - evolución según los estadios de desarrollo considerados. Comparación entre promedios	177
Gráf. 8 - Desarrollo estrobilar en cultivos monofásicos: evolución hacia adultos. Muestras de origen ovino	186
Gráf. 9 - Desarrollo estrobilar en cultivos monofásicos: evolución hacia microquistes. Muestras de origen ovino	186
Gráf. 10 - Desarrollo estrobilar en cultivos monofásicos: evolución hacia adultos. Muestras de origen suino	187
Gráf. 11 - Desarrollo estrobilar en cultivos monofásicos: evolución hacia microquistes. Muestras de origen suino	187
Gráf. 12 - Desarrollo estrobilar <i>in vitro</i> - evolución según los estadios de desarrollo considerados. Muestras equinas	197
Gráf. 13 - Desarrollo estrobilar <i>in vitro</i> - evolución según los estadios de desarrollo considerados. Muestras ovinas	197
Gráf. 14 - Desarrollo estrobilar <i>in vitro</i> - evolución según los estadios de desarrollo considerados. Muestra bovina	198

Gráf. 15 - Desarrollo estrobilar <i>in vitro</i> - evolución según los estadios de desarrollo considerados. Muestras suínas	198
Gráf. 16 - Desarrollo estrobilar <i>in vitro</i> - evolución según los estadios de desarrollo considerados. Muestras humanas	199
Gráf. 17 - Desarrollo estrobilar <i>in vitro</i> - evolución según los estadios de desarrollo considerados. Comparación entre promedios (rectas de regresión)	199
(Pruebas <i>in vivo</i> - desarrollos biológicos en dirección vesicular)	
Gráf. 18 - Desarrollo vesicular <i>in vivo</i> - evolución según los estadios de desarrollo considerados. Muestras equinas	217
Gráf. 19 - Desarrollo vesicular <i>in vivo</i> - evolución de los diámetros quísticos máximos. Muestras equinas	217
Gráf. 20 - Desarrollo vesicular <i>in vivo</i> - evolución según los estadios de desarrollo considerados. Muestras ovinas	218
Gráf. 21 - Desarrollo vesicular <i>in vivo</i> - evolución de los diámetros quísticos máximos. Muestras ovinas	218
Gráf. 22 - Desarrollo vesicular <i>in vivo</i> - evolución según los estadios de desarrollo considerados. Muestras suínas	219
Gráf. 23 - Desarrollo vesicular <i>in vivo</i> - evolución de los diámetros quísticos máximos. Muestras suínas	219
Gráf. 24 - Desarrollo vesicular <i>in vivo</i> - evolución según los estadios de desarrollo considerados. Muestras humanas	220
Gráf. 25 - Desarrollo vesicular <i>in vivo</i> - evolución de los diámetros quísticos máximos. Muestras humanas	220
Gráf. 26 - Desarrollo vesicular <i>in vivo</i> - evolución según los estadios de desarrollo considerados. Comparación entre promedios	221
Gráf. 27 - Desarrollo vesicular <i>in vivo</i> - evolución de los diámetros quísticos máximos. Comparación entre promedios (rectas de regresión)	221
(Análisis morfométricos)	
Gráf. 28 - Determinación del número de factores a extraer: prueba gráfica de la pendiente de los valores propios (Scree test). Muestras animales naturales	240
Gráf. 29 - Análisis de Componentes Principales: distribución de las muestras animales naturales, agrupadas por especie de hospedador, considerando un único factor de variación	240
Gráf. 30 - Análisis de Componentes Principales: distribución de las variables según los dos factores de variación más importantes (solución no rotada). Muestras animales naturales	241
Gráf. 31 - Análisis de Componentes Principales: distribución de las muestras animales naturales, agrupadas por especie de hospedador, considerando los dos factores de variación más importantes (sin rotación)	241
Gráf. 32 - Análisis de Componentes Principales: distribución de las variables según los dos factores de variación más importantes (solución rotada). Muestras animales naturales	242
Gráf. 33 - Análisis de Componentes Principales: distribución de las muestras animales naturales, agrupadas por especie de hospedador, considerando los dos factores de variación más importantes (solución rotada)	242
Gráf. 34 - Distribución de las muestras animales naturales, agrupadas por especie de hospedador, según las variables <i>Longitud total de los ganchos grandes</i> y <i>Longitud de la hoja de los ganchos grandes</i>	243
Gráf. 35 - Distribución de las muestras animales naturales, agrupadas por especie de hospedador, según las variables <i>Longitud total de los ganchos pequeños</i> y <i>Longitud de la hoja de los ganchos pequeños</i>	243
Gráf. 36 - Distribución de las muestras animales naturales, agrupadas por especie de hospedador, según las variables <i>Longitud de la hoja de los ganchos pequeños</i> y <i>Longitud de la hoja de los ganchos grandes</i>	244

Gráf. 37 - Distribución de las muestras animales naturales, agrupadas por especie de hospedador, según las variables <i>Longitud total de los ganchos pequeños</i> y <i>Longitud total de los ganchos grandes</i>	244
Gráf. 38 - Mapa territorial obtenido en el Análisis Discriminante realizado con muestras animales naturales	248
Gráf. 39 - Distribución de las muestras animales naturales en el mapa territorial obtenido en el análisis discriminante	248
Gráf. 40 - Aplicación de las funciones discriminantes obtenidas, a los datos publicados de muestras procedentes de infestaciones naturales en animales	249
Gráf. 41 - Distribución de las muestras humanas y animales en el mapa territorial obtenido en el análisis discriminante	249
(Estudio de la influencia del hospedador)	
(Análisis morfométricos)	
Gráf. 42 - Variación de los valores observados en cada variable, entre las muestras naturales y sus respectivas muestras experimentales	256-257
Gráf. 43 - Determinación del número de factores a extraer: prueba gráfica de la pendiente de los valores propios (Scree test). Muestras murinas	260
Gráf. 44 - Análisis de Componentes Principales: distribución de las muestras murinas, agrupadas por especies de hospedador natural de origen, considerando un único factor	260
Gráf. 45 - Análisis de Componentes Principales: distribución de las variables según los dos factores de variación más importantes (solución no rotada). Muestras murinas	261
Gráf. 46 - Análisis de Componentes Principales: distribución de las muestras murinas, agrupadas por especie de hospedador natural de origen, considerando los dos factores de variación más importantes (sin rotación)	261
Gráf. 47 - Análisis de Componentes Principales: distribución de las variables según los dos factores de variación más importantes (solución rotada). Muestras murinas	262
Gráf. 48 - Análisis de Componentes Principales: distribución de las muestras murinas, agrupadas por especie de hospedador natural de origen, considerando los dos factores de variación más importantes (con rotación)	262
Gráf. 49 - Distribución de las muestras murinas, agrupadas por especie de hospedador natural de origen, según las variables <i>Longitud total de los ganchos grandes</i> y <i>Longitud de la hoja de los ganchos grandes</i>	263
Gráf. 50 - Distribución de las muestras murinas, agrupadas por especie de hospedador natural de origen, según las variables <i>Longitud total de los ganchos pequeños</i> y <i>Longitud de la hoja de los ganchos pequeños</i>	263
Gráf. 51 - Distribución de las muestras murinas, agrupadas por especie de hospedador natural de origen, según las variables <i>Longitud de la hoja de los ganchos pequeños</i> y <i>Longitud de la hoja de los ganchos grandes</i>	264
Gráf. 52 - Distribución de las muestras murinas, agrupadas por especie de hospedador natural de origen, según las variables <i>Longitud total de los ganchos pequeños</i> y <i>Longitud total de los ganchos grandes</i>	264

- ÍNDICE DE TABLAS -

(Revisión bibliográfica)	
(Especiación en <i>Echinococcus granulosus</i>)	
(Antecedentes. Taxonomía y terminología dentro del género <i>Echinococcus</i>)	
Tab. 1 - Especies y subespecies descritas dentro del género <i>Echinococcus</i>	41
(Criterios de identificación y caracterización de cepas)	
Tab. 2 - Criterios empleados en la diferenciación y caracterización de cepas en <i>Echinococcus</i>	47
Tab. 3 - Características morfológicas diferenciales entre cepas de <i>E. granulosus</i> (de Europa y Norte de África)	60

Tab. 4 - Cepas caracterizadas - Europa	74
Tab. 5 - Cepas caracterizadas - África	74
Tab. 6 - Cepas caracterizadas - Asia	75
Tab. 7 - Cepas caracterizadas - América	75
Tab. 8 - Cepas caracterizadas - Oceanía	75
Tab. 9 - Cepas caracterizadas - posibles correspondencias	76
(Material y métodos)	
(Procedimientos generales)	
(Obtención de los protoescolices)	
Tab. 10 - Composición de las soluciones empleadas en el proceso de obtención de los protoescolices	129
(Estudios de caracterización de las cepas del parásito)	
(Pruebas <i>in vitro</i>)	
Tab. 11 - Composición del medio de cultivo empleado en los desarrollos vesiculares	132
Tab. 12 - Composición del medio de cultivo empleado en los desarrollos estrobilares	136
(Estudio de la influencia del hospedador)	
(Análisis de perfiles proteicos y antigénicos en líquidos hidatídicos de quistes murinos)	
Tab. 13 - Preparación y utilización de las columnas de inmunoadsorción	147
Tab. 14 - Procedimiento de valoración, mediante la técnica ELISA, de los sueros hiperinmunes	149
Tab. 15 - Protocolo seguido en la realización de las inmunolectroforesis de los sueros hiperinmunes	150
Tab. 16 - Soluciones empleadas en el estudio de antígenos	151
(Resultados)	
(Observaciones previas)	
(Muestras animales y humanas)	
Tab. 17 - Valores observados (totales) de carga parasitaria	155
Tab. 18 - Valores observados (por órgano) de carga parasitaria	155
(Estudios de caracterización de las cepas del parásito)	
(Pruebas <i>in vitro</i>)	
Tab. 19 - Tiempos observados de desarrollo vesicular, para las distintas muestras, agrupadas por especie de hospedador de procedencia	171
Tab. 20 - Desarrollo observado en dirección estrobilar en varios cultivos monofásicos (vesículas)	183
Tab. 21 - Tiempos observados de desarrollo estrobilar (medio bifásico), para las distintas muestras, agrupadas por especie de hospedador de procedencia	193
(Pruebas <i>in vivo</i> - desarrollos biológicos en dirección vesicular)	
Tab. 22 - Resultados de las infestaciones experimentales, recogidos por lote de animales y por especie de hospedador natural origen de la muestra inoculada	214
(Análisis morfométricos)	
Tab. 23 - Resultados obtenidos en el cálculo del tamaño mínimo	232
Tab. 24 - Valores de las distintas variables consideradas, obtenidos en las muestras procedentes de infestaciones naturales	234-237
Tab. 25 - Correlaciones observadas entre las distintas variables analizadas; muestras de origen equino, suino, bovino y ovino	237
Tab. 26 - Resultados del Análisis de Componentes Principales (muestras equinas, suinas, bovinas y ovinas)	239
Tab. 27 - Resultados de Análisis Discriminante (muestras equinas, suinas, bovinas y ovinas) ..	245-246
Tab. 28 - Resultado del proceso de clasificación realizado con el Análisis de Discriminantes (muestras equinas, suinas, bovinas y ovinas)	247

(Estudio de la influencia del hospedador)	
(Análisis morfométricos)	
Tab. 29 - Valores de las distintas variables consideradas, obtenidos en las muestras procedentes de infestaciones experimentales	250-253
Tab. 30 - Comparación mediante la <i>t</i> de Student entre las muestras murinas y sus correspondientes muestras naturales	258
Tab. 31 - Correlaciones observadas entre las distintas variables analizadas; muestras murinas	258
Tab. 32 - Resultado del Análisis de Componentes Principales (muestras murinas)	259
(Discusión)	
(Estudios de caracterización de las cepas del parásito)	
(Pruebas <i>in vitro</i>)	
Tab. 33 - Comparación de los resultados obtenidos en los desarrollos vesiculares <i>in vitro</i> , con los publicados por otros investigadores	287
Tab. 34 - Comparación de los resultados obtenidos en los desarrollos estrobilares <i>in vitro</i> , con los publicados por otros investigadores	294
(Pruebas <i>in vivo</i>)	
Tab. 35 - Comparación de los resultados publicados, relativos al promedio de quistes desarrollados en cada animal (ratón). Lotes inoculados con muestras de origen ovino	300
(Análisis morfométricos)	
Tab. 36 - Comparación de los resultados obtenidos en el análisis morfométrico de muestras ovinas, con los datos publicados por otros investigadores	308
Tab. 37 - Comparación de los resultados obtenidos en el análisis morfométrico de muestras equinas, con los datos publicados por otros investigadores	309
Tab. 38 - Comparación de los resultados obtenidos en el análisis morfométrico de muestras suinas, con los datos publicados por otros investigadores	310
Tab. 39 - Comparación de los resultados obtenidos en el análisis morfométrico de muestras bovinas, con los datos publicados por otros investigadores	311
Tab. 40 - Comparación de los resultados obtenidos en el análisis morfométrico de muestras humanas, con los datos publicados por otros investigadores	312

INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN

La Hidatidosis es una antropozoonosis de distribución cosmopolita, causada por las especies del género Echinococcus, pequeños cestodos que, en su fase larvaria, pueden desarrollarse en una gran cantidad de herbívoros y omnívoros, incluyendo al hombre.

La importancia de esta parasitosis en nuestro país (causada sólo por E. granulosus) es indiscutible, debido a las repercusiones sanitarias, veterinarias y económicas que tiene. Incluida dentro del grupo de las Enfermedades de Declaración Obligatoria (EDOs) desde 1982 (BOE número 13, de 15 de Enero), su control es un objetivo prioritario, llevándose a cabo a través de los programas de lucha antihidatídica implementados en distintas Comunidades Autónomas en la década de los '80 y primeros años de los '90. A nivel científico, son numerosos los estudios epidemiológicos, inmunológicos (de diagnóstico) y quimioterápicos (de tratamiento y profilaxis) llevados a cabo. A pesar de todos estos esfuerzos, sólo se han conseguido éxitos parciales; los aspectos socioculturales y educativos de la población son algunos de los principales factores que contribuyen a la falta parcial de éxito en los distintos programas de control puestos en marcha.

A esta situación debe añadirse un nuevo e importante factor: la variabilidad intraespecífica presente en Echinococcus granulosus. La constatación, en diferentes países, de la existencia de variantes o cepas del parásito, con características epidemiológicas, biológicas, bioquímicas, inmunológicas y genéticas diferentes, podría explicar, al menos en parte, los resultados no muy satisfactorios obtenidos en apartados como el diagnóstico, el tratamiento o la profilaxis de la enfermedad.

Ante la nueva situación planteada por este hecho, la OMS, en 1986, indicó como una de las líneas prioritarias de la lucha contra la Hidatidosis, el estudio de este fenómeno de variabilidad intraespecífica, principalmente en zonas donde esta zoonosis fuese endémica (caso del sur de Europa, incluyendo a España). Así mismo, se recomendaba utilizar un enfoque multidisciplinar, aplicando el mayor número posible de criterios (genéticos, bioquímicos, morfológicos, inmunológicos, de capacidad de desarrollo *in vivo* e *in vitro*, farmacológicos, etc.).

Los primeros estudios al respecto llevados a cabo en nuestro país fueron realizados en nuestro Departamento por la Dra. Cuesta Bandera en 1988 (Cuesta Bandera, 1988; Cuesta Bandera *et al.*, 1988), identificando, mediante análisis de ADN, tres cepas diferentes (ovina-bovina-humana, suina-caprina, y equina). La continuación y ampliación de estos estudios se está llevando a cabo en nuestro laboratorio, siguiendo las recomendaciones de la OMS, mediante la aplicación de diferentes técnicas que, a nivel genético, bioquímico e inmunológico, han sido recientemente empleadas por Siles Lucas (1993). En el presente trabajo, nos hemos planteado abordar el estudio biológico y morfológico de las variantes españolas de este cestodo, con objeto de determinar si las diferencias indicadas, a nivel de ADN, tienen reflejo *in vivo* en la fisiología, el desarrollo o la morfología del parásito. Pretendemos, con ello, contribuir al mejor conocimiento y clarificación del fenómeno de especiación de E. granulosus, y a sus posibilidades de control, en nuestro país.

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1. EL PARÁSITO: IDENTIFICACIÓN, ENCUADRE TAXONÓMICO Y BIOLOGÍA

2.1.1. RESEÑA HISTÓRICA

Los quistes hidatídicos y otras formas larvarias de cestodos son conocidos tanto en animales como en el hombre desde la antigüedad, pero la naturaleza parasitaria de dichas "vesículas" fue desconocida durante mucho tiempo. Hipócrates (460-379 a.C.) ya hizo mención de los quistes hidatídicos, como tumores llenos de agua, en los pulmones de vacas, ovejas y cerdos, así como también en humanos (atribuyendo la rotura de los mismos y la salida del "agua" a la cavidad corporal como causa de muerte). Se pensaba que estas vesículas rellenas de agua podían ser formadas por el animal como una reserva de líquidos para aguantar los períodos de sequía.

Con posterioridad, y en siglos sucesivos, fueron apareciendo trabajos médicos en los que se mencionaban quistes hidatídicos (y otras formas larvarias de otros cestodos), aunque sin comprenderse todavía su auténtico origen. Normalmente, se suponía que eran excrecencias que se producían en la víscera afectada, formadas por suero y mucus, ocasionalmente con pus; o bien glándulas hipertrofiadas y degeneradas; o (tras el descubrimiento de los ganglios linfáticos en el siglo XVII), ganglios distendidos y/o varicosos.

A finales del siglo XVII se empezó a considerar estas vesículas como animales, debido a que muchas de ellas presentaban movimientos espontáneos, y se les identificó como formas relacionadas con helmintos intestinales (embriones de ellos). En 1766, Pallas diferenció las formas quísticas de los helmintos de otros quistes tisulares, e hizo mención de la similitud de dichas formas

quísticas con la cabeza (el escólex) de los cestodos adultos. Sin embargo, en el caso de los quistes hidatídicos, no pudo reconocer ninguna estructura del adulto, ya que, aunque describió un gran número de pequeños cuerpos en su interior, sus observaciones sólo pudieron ser macroscópicas y no pudo establecer su naturaleza. Sin embargo, siguió considerando estos quistes como originados por cestodos.

En 1782, Johann Goeze describió los protoescólices de los quistes hidatídicos, indicando su similitud con los escólex de los cestodos. Debido a su localización visceral, a que en los órganos por él examinados aparecían gran cantidad de quistes, y al aspecto granulado de la arena hidatídica, denominó a estos quistes Taenia visceralis socialis granulosa. Poco después (1786), Batsch renombró al parásito como Hydatigera granulosa.

En 1800, Zeder estableció una clasificación en la que separaba en distintos grupos cestodos y formas quísticas. A los quistes hidatídicos los denominó inicialmente Polycephalus hominis, renombrándolos en 1803 como Polycephalus echinococcus. En 1804, Laennec, investigando quistes hidatídicos humanos, no pudo encontrar las "cabezas de gusano" (los protoescólices) observados en los quistes de ovejas y bueyes, por lo que supuso que aquellos debían pertenecer a otro género, e incluso ser de naturaleza totalmente diferente. A estos quistes los denominó acefaloquistes. Este punto de vista fue aceptado hasta 1843, en que Livois demostró que los acefaloquistes son quistes hidatídicos normales en los cuales todavía no se han desarrollado los protoescólices.

Rudolphi describió, en 1801, el género Echinococcus (al que situó en el Orden Cysticorum); posteriormente (1805-1810), dividió el género en tres especies: E. hominis, E. simiae y E. veterinorum, según el hospedador al cual él pensó que afectaban (hombres, primates y ruminantes -ovejas y vacas-, respectivamente).

Durante las décadas posteriores hubo discrepancias entre los helmintólogos respecto al número de especies que formaban el género. Bremser, y con posterioridad Diesing, supusieron que los protoescólices recuperados de quistes humanos eran del mismo tipo que los de quistes animales, denominando este último al cestodo como Echinococcus polymorphus. Sin embargo, la práctica más común era considerar dos especies: una, que afectaba al hombre, y con una sola corona de ganchos en el rostelo de los protoescólices, denominada E. hominis; y otra, presente en animales y con una doble corona de ganchos, denominada E. veterinorum. Küchenmeister, a mediados del siglo XIX, clasificó dos especies en función del contenido de la arena hidatídica: E. scolicipariens, en el que sólo había protoescólices en la arena, y E. altricicipariens, con protoescólices y cápsulas prolíferas. Leuckart aceptó inicialmente esta clasificación y propuso los nombres de E. simplex y E. hydatidosa, respectivamente, para estas dos especies. Sin embargo, en 1863, Naunyn demostró que los adultos obtenidos a partir de los protoescólices de ambas especies eran idénticos; además, tras una única infección, el mismo animal hospedador podía tener quistes con o sin cápsulas prolíferas. En base a ello, invalidó la separación en dos especies.

Con el reconocimiento de que tanto la forma quística como el verme adulto pertenecían a una misma especie, el parásito fue finalmente nombrado como E. granulosus.

En el *Index Catalogue of Medical and Veterinary Zoology* (citado por Grove, 1990), el nombre completo con el que se cita al parásito es Echinococcus granulosus ([Goeze 1782] Batsch 1786) Rudolphi 1805.

2.1.2. POSICIÓN TAXONÓMICA

La sistemática de los cestodos ha sufrido muchas modificaciones desde 1758 (en que Linneo establece el Phylum Vermes, agrupando a todos los "gusa-

nos" de vida tanto libre como parásita) hasta la actualidad¹. Así mismo, dentro del género Echinococcus se han descrito numerosas especies y subespecies, muchas de ellas posteriormente invalidadas. En la presente Memoria se sigue la clasificación de Yamaguti (1959) y Schmidt (1986) para el género, y la de Kumaratilake & Thompson (1982a) y Thompson (1986, 1995) para las especies de éste, siendo el encuadre taxonómico el siguiente:

Phylum PLATYHELMINTHES Gegenbaür, 1859.

Cuerpo blando, triblástico, acelomado; comprimidos dorsoventralmente; con una capa celular recubriendo el cuerpo; sistema excretor formado por protonefridios.

Clase CESTODA (Rudolphi 1804)

Endoparásitos; tubo digestivo ausente; capa externa del cuerpo recubriendo un tegumento sincitial, con microtriquias.

Subclase EUCESTODA Southwell, 1930

Adultos con un cuerpo elongado (estróbilo) formado por una serie de anillos (proglótides) con los órganos reproductores; escólex (órgano especializado en la sujeción) en posición anterior; hermafroditas, con ciclos indirectos.

Orden CYCLOPHYLLIDEA Beneden in Braun, 1900

Escólex con 4 ventosas musculares y con un rostelo normalmente armado; estróbilo formado por proglótides en varios estadios de desarrollo, cada proglótide claramente marcado por una segmentación externa; huevos esféricos no operculados, con una oncosfera con 6 ganchos (embrión hexacanto).

Familia TAENIIDAE Ludwig, 1886

Adultos en el intestino delgado de carnívoros y humanos; cualquier mamífero como posible hospedador intermediario; escólex con un rostelo normalmente armado con una doble corona de ganchos; genitalia impar en cada proglótide, con el poro genital marginal alternando irregularmente; huevos con una cubierta exterior fuertemente estriada.

Género Echinococcus Rudolphi, 1801

E. granulosus (Batsch, 1786)

E. multilocularis Leuckart, 1863

E. oligarthrus (Diesing, 1863)

E. vogeli Rausch & Bernstein, 1972

(1) Para un conocimiento más detallado de la evolución histórica de la sistemática de los cestodos ver Stunkard, H.W. (1986): Evolution and Systematics; en: Arne, C. & Pappas, P.W. (Eds.): *Biology of Eucestoda* (vol. I), Academic Press, New York; páginas 2-6.

Echinococcus multilocularis presenta una distribución cosmopolita, si bien no homogénea; en el caso de Europa, aunque los datos son incompletos, existen regiones endémicas en Francia, Alemania, Suiza y Austria (Rausch, 1967). Hasta el momento no se ha presentado ninguna infestación autóctona con E. multilocularis en la península Ibérica. Esta especie afecta típicamente a zorros (Vulpes y Alopex) como hospedadores definitivos, y a gran cantidad de roedores (sorícidos, tálpidos, esciúridos, cricétidos, arvicolinos, múridos, etc.) como hospedadores intermediarios. En éstos, la larva se desarrolla con rapidez (es una adaptación al corto período de vida de dichos roedores), localizándose en el hígado; en las infestaciones crónicas puede producirse metástasis a otros órganos. El perro doméstico y los gatos pueden sustituir al hospedador definitivo natural, y, aunque su papel en el ciclo del parásito pueda ser pequeño, su importancia radica en el riesgo potencial de infestación para el hombre.

E. oligarthrus se localiza en Centro y Suramérica. El adulto se desarrolla sólo en carnívoros de la familia Felidae, encontrándose la larva en diversos roedores (no hay una gran especificidad por el hospedador intermediario). El adulto puede desarrollarse también en gatos domésticos, siendo éstos la fuente de infestaciones para el hombre. Hasta el momento, sólo se ha descrito un caso humano (de localización ocular), en Venezuela (Lopera *et al.*, 1989).

E. vogeli, al igual que E. oligarthrus, se distribuye únicamente en Centro y Suramérica. El adulto sólo se ha encontrado, en condiciones naturales, en el perro de los matorrales (Speothos venaticus), siendo el hospedador intermediario típico la paca (Cuniculus paca), en donde la larva se desarrolla normalmente en el hígado. El perro puede servir también de hospedador definitivo (en el norte de Suramérica las pacas sirven de alimento en las zonas rurales, siendo las vísceras con frecuencia echadas a los perros), pudiendo ser éstos una posible fuente de infestación para el hombre. En éste provoca una hidatidosis poliquística (D'Alessandro *et al.*, 1979; Meneghelli *et al.*, 1986).

E. granulosus, de distribución cosmopolita, es el parásito al cual, a partir de este momento, nos referiremos, por ser el objeto de nuestro estudio.

2.1.3. MORFOLOGÍA

2.1.3.1. Adulto

El verme adulto tiene una longitud de hasta 6-8 mm, localizándose en el intestino delgado de varias especies de carnívoros, anclado en las criptas de Lieberkühn (Thomson, 1977; Thompson *et al.*, 1979). Posee un escólex armado con una doble corona de ganchos (una exterior de ganchos pequeños y una interior de ganchos grandes), y 4 ventosas. El cuello (o región proliferativa) es corto y da lugar a un estróbilo formado por 3 a 6 proglótides (normalmente 3), de los cuales sólo el último es grávido (Figura 1). Son animales hermafroditas, pudiendo presentar tanto fecundación cruzada (no observada, aunque los datos de algunos estudios genéticos -Lymbery & Thompson, 1988- indican que es posible que se produzca en poblaciones naturales) como autofecundación, siendo este último proceso el que parece más común (Kumaratilake *et al.*, 1986). Esto, según algunos autores, puede significar una ventaja para un animal tan pequeño como éste, para el que puede ser difícil encontrar a otro individuo en el intestino del hospedador, sobre todo en infestaciones débiles (Thompson, 1986, 1995).

La superficie corporal del verme adulto es similar a la de otros helmintos, estando constituida por un sincitio citoplásmico formado a partir de células localizadas en el parénquima subyacente (células tegumentales); dicho sincitio, denominado tegumento, posee en su lado externo microtriquias. Algunos autores han sugerido que dichas microtriquias puedan ayudar a la fijación del parásito, interdigitándose con las microvellosidades intestinales (Threadgold, 1962;

Rothman, 1963; Mettrick & Podesta, 1974). Sin embargo, Thompson *et al.* (1979) no encontraron ningún tipo de interdigitación, observando incluso destrucción ocasional de las microvellosidades a las que el rostelo del parásito se había fijado. Morfológicamente, hay dos tipos distintos de microtriquias, con una distribución diferente, y quizá también con una función fisiológica diferente (Thompson *et al.*, 1982; Irshadullah *et al.*, 1990): en el estróbilo son rígidas, quizá para permitir que las superficies de absorción del parásito y del hospedador estén separadas, permitiendo el flujo de nutrientes entre ambas. En el extremo del rostelo y en el escólex las microtriquias son largas y flexibles, quizá para permitir un contacto mayor con el hospedador y potenciar así la adhesión.

Por debajo del sincitio, separando éste de las células tegumentales y de fibras musculares, se localiza una capa de fibrillas de tejido conectivo irregularmente dispuestas (Morseth, 1966).

En la región anterior del escólex se encuentra una glándula cuya secreción es una sustancia proteica, quizá con un componente lipídico (Thompson *et al.*, 1979). La función de esta glándula no es aún bien conocida. Según Smyth (1964b) puede tener una función histolítica, de significación nutricional, permitiendo obtener nutrientes bien de la lisis de células del hospedador, bien de la interacción de la secreción de la glándula con secreciones del hospedador (p.e., mucina); Janssen *et al.* (1991) consideran que el escólex es capaz de digerir proteínas en la interfase parásito-hospedador. Otra posible función es la de ayudar en la fijación del parásito al intestino del hospedador (Smyth, 1964a; Thompson & Eckert, 1973), pudiendo estar relacionada con la apólisis, aumentando el grado de adherencia cuando se produce la liberación de los proglótides grávidos (Thompson, 1986, 1995). Es también posible que tenga un papel protector, inhibiendo o inactivando las enzimas digestivas del hospedador, o interfiriendo con los mecanismos efectores del sistema inmune (Thompson *et al.*, 1979).

El rostelo es armado, constituido por una doble corona de ganchos: una externa de ganchos pequeños y una interna de ganchos grandes. Están compuestos por una proteína de tipo queratina, distinta de la queratina de vertebrados, y con total ausencia de quitina (Gallagher, 1964; Smith & Richards, 1991). El número de ganchos por rostelo es variable; según Yamashita *et al.* (1958), hay entre 32 y 40; según Lubinsky (1960), de 28 a 46; según Thompson *et al.* (1984), de 19 a 44.

Las longitudes de los ganchos varían también ligeramente según los autores: para los ganchos grandes, Vogel (1957) da valores entre 33.2 y 39.8 μm (promedio de 36.8 μm); Euzéby (1960), entre 30-35 μm ; Thompson *et al.* (1984), entre 27 y 41 μm , según el hospedador al cual infestaba la larva (promedios de 31.8 a 39.1 μm). Para los ganchos pequeños la longitud oscila dentro del rango de variación de 19.0 a 34.7 μm , dado por Thompson *et al.* (1984). El crecimiento de los ganchos continúa en el adulto (Rausch, 1953; Yamashita *et al.*, 1956a; Verster, 1965), produciéndose por adición de nuevo material a determinadas partes del gancho; la hoja, en particular, parece sufrir pocos cambios desde el protoescólex al adulto (Hobbs *et al.*, 1990), posiblemente debido a que la síntesis y secreción del material de los ganchos se produce en el tegumento que cubre la base de los mismos (Mount, 1970; Hulinska & Fedoseenko, 1977).

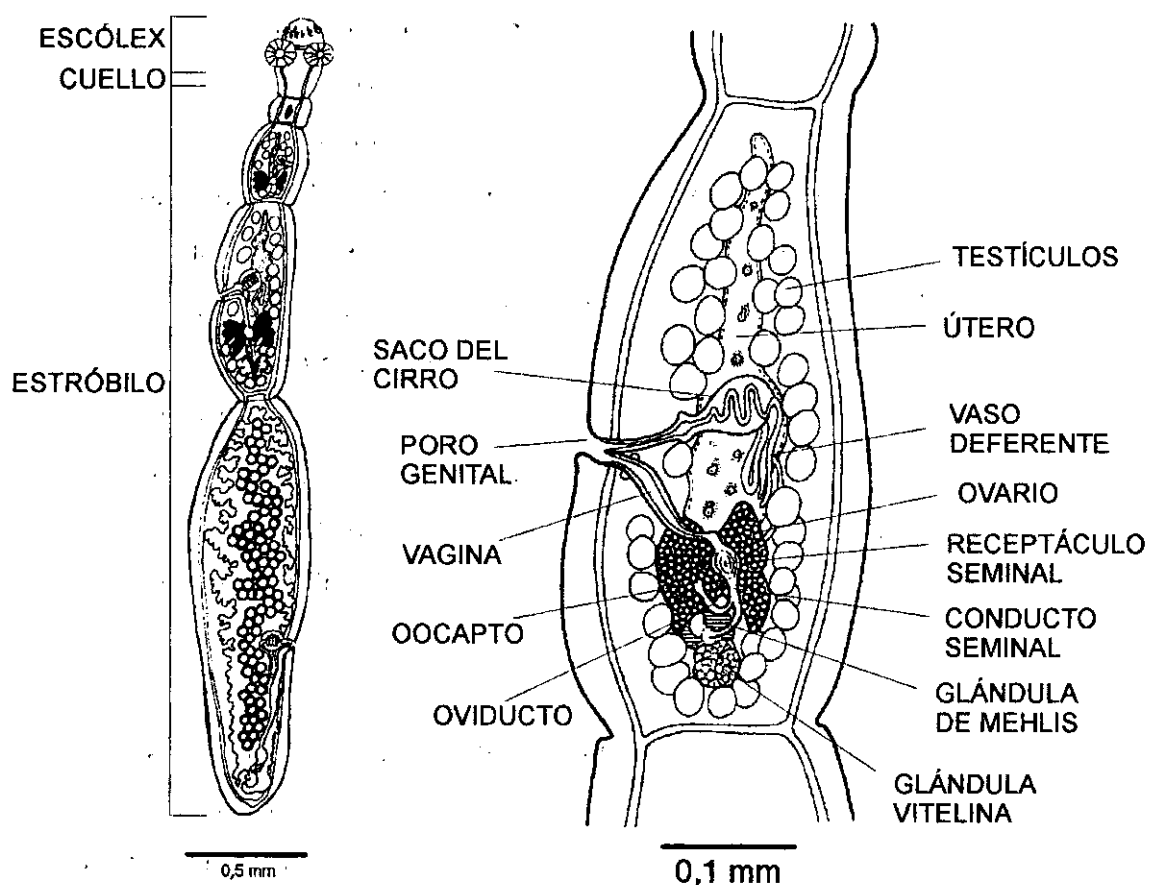
El sistema nervioso presenta una ligera cefalización, consistiendo ésta en expansiones anteriores de los dos cordones nerviosos principales formando unos ganglios cerebrales, comunicados entre sí por comisuras transversales. De dichos ganglios salen cordones nerviosos anteriores (inervan las ventosas, los ganchos, la glándula del rostelo y el tegumento del escólex) y posteriores (recorren longitudinalmente el cuello y el estróbilo), éstos paralelos y externos a los canales excretores (Lumsden & Hildreth, 1983). Hay una gran cantidad de terminaciones sensoriales localizadas en el tegumento del parásito, con prolongaciones distales que sobresalen al exterior (Morseth, 1967).

El sistema excretor, muy simple, es de tipo protonefridial; está formado por células flamígeras, o solenocitos, localizados en todo el cuerpo del parásito, y que actúan a modo de filtros. Su batir de flagelos introduce las sustancias de desecho presentes en los fluidos extracelulares en un sistema de túbulos de varios tamaños, que convergen en unos tubos principales, los canales excretores. Éstos, en número de 4 (dos en cada lado, uno dorsal y uno ventral), recorren lateral y longitudinalmente, desde el escólex, el cuerpo del animal, comunicando con el exterior en el extremo posterior del último proglótide (Lumsden & Hildreth, 1983). Los 4 canales están comunicados, en posición anterior (bajo el rostelo), por un conducto circular; los canales ventrales, además, están comunicados entre sí al final de cada proglótide por otro canal transverso (Smyth 1964b; Lumsden & Hildreth, 1983).

En la región del cuello se hayan presentes células indiferenciadas responsables del desarrollo del estróbilo. Según Sakamoto & Sugimura (1970) y Gustafsson (1976), habría un único tipo de células germinativas, a partir del cual se desarrollarían los demás tipos celulares. Dichas células, muy basófilas y con núcleos grandes y nucléolos prominentes, constituirían el 24% de la población celular, estando localizadas en su mayoría en el parénquima interno y en la proximidad de los cordones nerviosos (Gustafsson, 1976). El desarrollo y la diferenciación de estas células sería muy sensible a condiciones ambientales y/o nutricionales (Smyth & Barrett, 1979).

Respecto a la estructura del estróbilo (Figura 1), el primer proglótide es inmaduro, no presentando mas que esbozos de las gónadas. El siguiente es un proglótide maduro, con numerosos testículos (entre 25 y 80, según los autores) situados en posición anterior y lateral respecto al útero. Los conductos deferentes de dichos testículos convergen en un cirro que comunica al exterior en un poro genital, abierto en el margen del anillo en posición media-posterior, alternando irregularmente en los distintos proglótides.

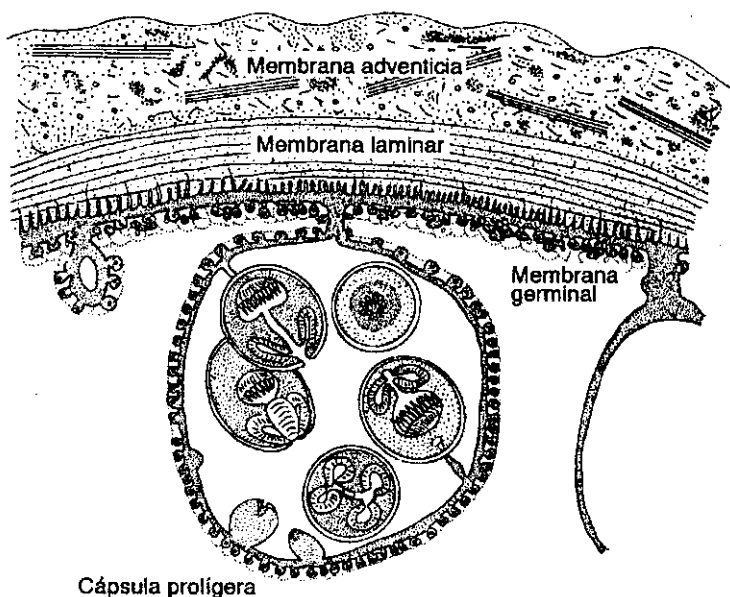
Figura 1 - Morfología de Echinococcus granulosus.



Izquierda, morfología del adulto (a partir de Thompson, 1986). Derecha, detalle del anillo grávido (a partir de Eckert *et al.*, 1989).



Estructura del huevo
(a partir de Lethbridge, 1980).



Estructura del quiste hidatídico (tomado de Ubelaker, 1983).

El ovario es único, estando las glándulas vitelógenas localizadas por detrás del mismo. El útero está constituido por un eje central con pequeñas expansiones laterales, equivalentes a las ramas uterinas de otros ténidos. En el interior de dicho útero, en el último segmento (anillo grávido), se encuentran los huevos, rodeados por una cubierta externa, vitelina. El número de éstos por anillo es incierto, variando según distintos autores entre 100 y 1500 por proglótide (Arundel, 1972; Rausch, 1975; Thompson & Eckert, 1982; Heath & Lawrence, 1991).

2.1.3.2. Huevo

Los huevos de los ténidos (Figura 1) son de forma esférica o elipsoidal, con un tamaño variable entre 30-50 μm y 22-44 μm en sus dos diámetros. Morfológicamente, los huevos de E. granulosus, E. multilocularis y varias especies de Taenia son indistinguibles, presentando varias capas y membranas (Morseth, 1965; Lethbrige, 1980; Sakamoto, 1981; Swiderski, 1982).

La capa más externa es el embrióforo, proporcionando una protección física a la oncosfera. Rodeando al embrióforo se forma, en el proglótide, una capa vitelina (la envuelta externa), que desaparece antes de que el huevo salga al exterior con las heces. El embrióforo es relativamente grueso e impermeable, estando formado por bloques poligonales de una proteína de tipo queratina, unidos mediante una sustancia cementante (Morseth, 1966; Nieland, 1968). Esta estructura hace que los huevos de Echinococcus sean muy resistentes, pudiendo soportar una gran variedad de temperaturas ambientes (Lawson & Gemmell, 1983; Wachira *et al.*, 1991). En el interior se encuentra la oncosfera, formada por un conjunto de células glandulares, musculares y germinales (Swiderski, 1983). Posee como estructura más llamativa 6 ganchos, a los que debe su nombre de embrión hexacanto. Dichos ganchos, de 10-12 μm de longitud, están

distribuidos en un par en posición media y dos pares laterales; en cada uno de estos últimos, el gancho de posición dorsal es ligeramente mayor que el de posición ventral (Swiderski, 1983).

2.1.3.3. Metacestodo

La larva completamente desarrollada es típicamente unilocular, de forma en general esférica (puede tener otras formas por adaptación a las condiciones particulares del órgano en que se encuentra), y rellena de un líquido transparente (el líquido hidatídico).

El quiste hidatídico propiamente dicho es el conjunto formado por la larva del parásito y la membrana adventicia (la envuelta más externa, formada por el hospedador); sin embargo, en muchas ocasiones se aplican ambos términos indistintamente, ya que cada larva se desarrolla formando un único quiste hidatídico. Teniendo esto último en cuenta, y por simplificar, en la presente Memoria emplearemos en general el término *quiste hidatídico* cuando nos refiramos a la forma larvaria del parásito.

Mientras que en los quistes estériles, o acefaloquistes, no se han formado protoescólices, en los quistes fértiles existen protoescólices y cápsulas prolíferas (denominados, en conjunto, arena hidatídica), adheridos a la pared quística o flotando libremente en el líquido hidatídico.

Según Smyth (1964), el término *protoescólex* fue inicialmente usado por Carta & Deiana (1960), siendo propuesto por dicho autor (Smyth, 1962a,b, 1964) para designar a la forma inmadura de *E. granulosus* (hasta entonces denominada escólex) y así diferenciarla del escólex morfológico.

La estructura del quiste es muy sencilla (Figura 1): en contacto con el líquido de la cavidad interna se encuentra una capa de células vivas, la membrana germinal, soportada por su lado externo por una capa constituida por varias laminaciones de un espesor variable (la membrana laminar). Esta membrana laminar está rodeada por una capa fibrosa (la membrana adventicia)

formada por el hospedador como respuesta a la presencia del parásito. El crecimiento del quiste es de tipo concéntrico y expansivo, pudiéndose producir estrangulamientos que originan cámaras secundarias intercomunicadas con la cavidad central, en ocasiones separadas por septos incompletos (Vanek, 1980). En los quistes fértiles de gran tamaño pueden a su vez formarse quistes secundarios (sin membrana adventicia) dentro del quiste primario, por procesos de vesiculización de los protoescólices (Rogan, 1988; Richards & Morris, 1989).

La membrana adventicia es una cápsula fibrosa que rodea por completo al parásito. Es el producto de una reacción inflamatoria celular iniciada en los estadios iniciales de desarrollo post-oncosferral (Smyth & Heath, 1970; Slais & Vanek, 1980). La intensidad de esta reacción varía según el individuo hospedador e influye en la tasa de desarrollo posterior del metacestodo: si es una reacción muy intensa puede causar la degeneración y muerte de la larva, mientras que, si es una reacción relativamente débil, el parásito puede sobrevivir y crecer, quedando entonces rodeado por dicha membrana adventicia.

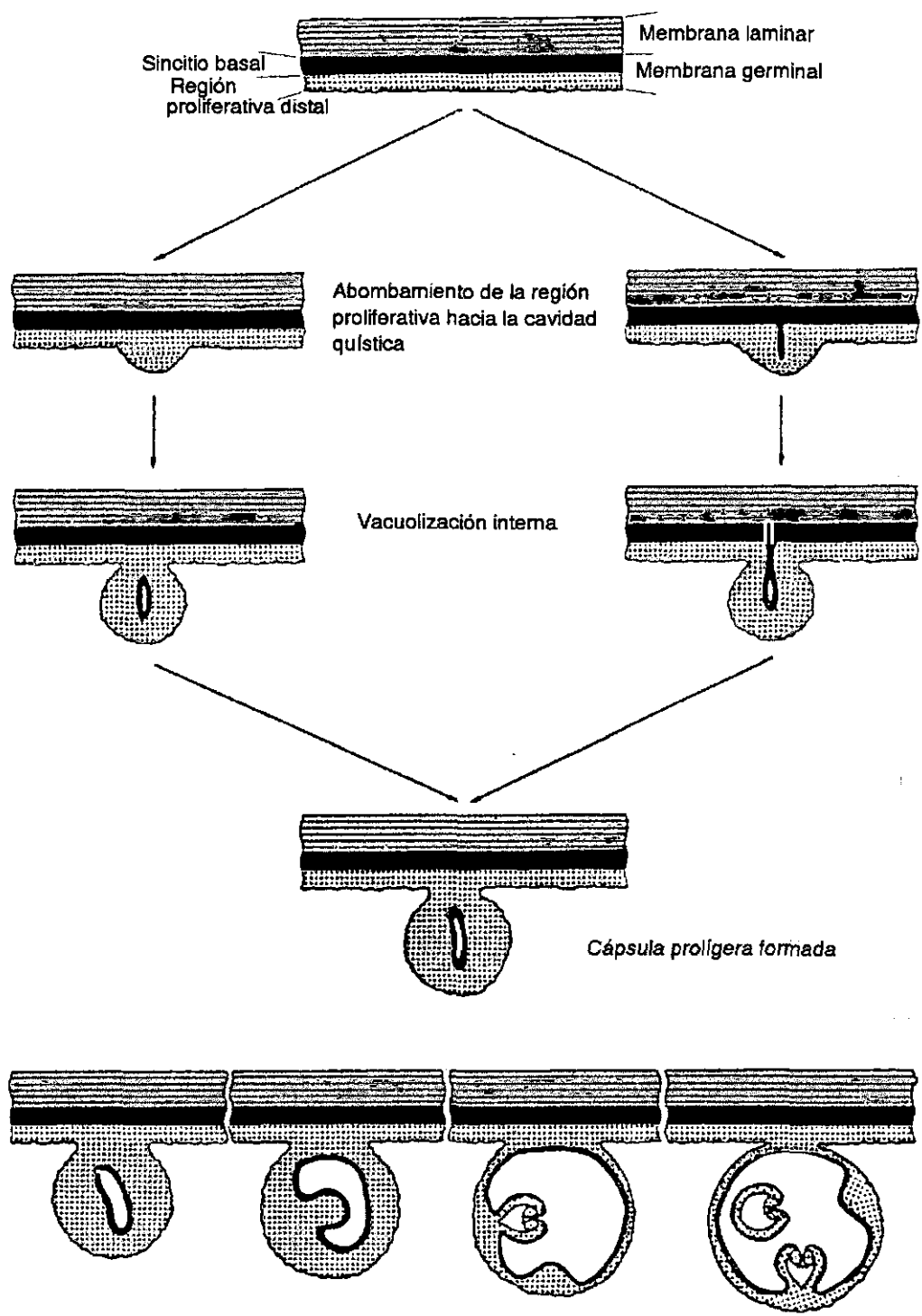
La membrana laminar es fuertemente PAS+, constituida por un complejo de glucoproteínas en las que predomina la galactosamina sobre la glucosamina (Kilejian & Schwabe, 1971; Leducq & Gabrion, 1992). Está constituida por una matriz de fibras irregularmente dispuestas, con agregados de material particulado (Morseth, 1967; Richards *et al.*, 1983); a intervalos regulares se producen capas más densas, siendo en dichas zonas en donde se puede con frecuencia apreciar la separación entre dichas laminaciones (Morseth, 1967). Diversos estudios de microscopía electrónica (Bortoletti & Ferretti, 1973; Lascano *et al.*, 1975; Verheyen, 1982; Richards *et al.*, 1983; Harris *et al.*, 1989; Rogan & Richards, 1989; Leducq & Gabrion, 1992; Casado Escribano *et al.*, 1992) y de desarrollos *in vitro* (Smyth, 1962; Heath & Osborn, 1976) sugieren que esta membrana laminar es de origen parasitario, siendo secretada por la membrana germinal.

La membrana germinal del quiste hidatídico presenta una estructura celular muy similar a la del tegumento del verme adulto (Morseth, 1967). Esta membrana germinal se puede considerar formada por dos regiones, una basal y una distal. La porción basal es un sincitio citoplásmico, anucleado, formado a partir de procesos citoplásmicos externos de las células tegumentales (localizadas en la región distal); esta región está unida a la membrana laminar por proyecciones digitiformes (microtriquias) que penetran en la misma (Morseth 1967; Lascano *et al.*, 1975; Bortoletti & Ferretti, 1973, 1978; López-Campos *et al.*, 1978; Conder *et al.*, 1983; Jin-Feng *et al.*, 1992; Yu, 1992). La región distal está constituida por varios tipos celulares (células tegumentales, musculares, excretoras, almacenadoras de glucógeno e indiferenciadas) (Bortoletti & Ferretti, 1973, 1978; Jin-Feng *et al.*, 1992; Yu, 1992), pudiéndose encontrar también en esta zona cuerpos amiláceos (corpúsculos calcáreos) (Lascano *et al.*, 1975) y canales citoplásmicos (Conder *et al.*, 1983).

Las células indiferenciadas son proliferativas, siendo las responsables de la formación de las cápsulas prolíferas. Éstas se originan como pequeñas masas que proliferan hacia la cavidad quística, se agrandan, manteniéndose unidas a la pared del quiste mediante un pedicelo, y se vacuolizan, formándose en su interior, por repetición de este proceso, un número variable de protoescólices (Bortoletti & Ferretti, 1973; Thompson, 1976) (Figura 2). La pared de las cápsulas prolíferas está muy vacuolizada, poseyendo núcleos a intervalos irregulares. En el interior de la cápsula se encuentra una sustancia PAS+, así como restos procedentes de protoescólices degenerados. Esta sustancia PAS+ permanece como una cubierta sobre el tegumento de los protoescólices, siendo posiblemente la responsable de la adherencia de éstos cuando son sacados de los quistes (Morseth, 1967). Quizá la función de dicha cubierta sea más de mecanismo de defensa frente a enzimas proteolíticas (del hospedador definitivo), que de adherencia.

El proceso de formación de los protoescólices en las cápsulas prolíferas es asíncrono, pudiendo observarse varios estadios de desarrollo diferentes en

Figura 2 - Proceso de formación de las cápsulas prolíferas y protoescólices (tomado de Bortoletti & Ferretti, 1978).



la misma cápsula prolígera (Pennoit-De Cooman & De Rycke, 1972; Thompson, 1976a; Rogan & Richards, 1987). El número de protoescólices formados en cada cápsula prolígera es variable, presentando un número también variable de individuos degenerados. El escólex está más o menos diferenciado según el grado de maduración del protoescólex, presentándose invaginado en los individuos completamente desarrollados.

El tegumento de los protoescólices es similar al de los adultos, presentando también microtriquias diferenciadas en la parte anterior, pero ausentes en la región posterior del animal (Smyth, 1967; Morseth, 1967; Sakamoto & Sugimura, 1969; Marchiondo & Andersen, 1983); en esta zona, recubierta por una sustancia PAS+, hay pequeñas protuberancias que podrían corresponder a microtriquias aún no desarrolladas (Morseth, 1967; López-Campos *et al.*, 1978).

Hay presente una doble corona de ganchos, más pequeños que los del verme adulto, pero con la misma estructura que en éste. Dichos ganchos, junto con las ventosas, están normalmente invaginados en el cuerpo del protoescólex. Su origen está en microtriquias especializadas que forman la hoja del gancho; a partir del tegumento de la base de la microtriquia se formará el resto de las estructuras del gancho (Mount, 1970; Rogan & Richards, 1987).

Distribuidos por los tejidos del animal se encuentran abundantes solenocitos y conductos colectores (Morseth, 1967). También hay corpúsculos calcáreos, generalmente abundantes (forman hasta el 14.3% del peso seco del protoescólex) (von Brand *et al.*, 1965; Smith & Richards, 1993). Dichos corpúsculos consisten en una matriz orgánica, normalmente organizada en anillos concéntricos, con componentes inorgánicos (principalmente, calcio, magnesio, fósforo y carbonatos) (von Brand *et al.*, 1965, 1967). El origen de estos corpúsculos calcáreos son células vivas que degeneran al formar los corpúsculos (Pawloski *et al.*, 1988; Ohnishi & Kutsumi, 1991). La función de estas estructuras no está clara; puede que sirvan como tampones y/o como reservorios de fosfatos para

necesidades metabólicas (McManus & Bryant, 1986; Smith & Richards, 1993)¹. También se ha sugerido la existencia de factores anti-complementarios asociados con los corpúsculos calcáreos, tanto en E. granulosus como en E. multilocularis (Kassis & Tanner, 1976a). Cabrera *et al.* (1992) han sugerido que tengan función excretora, sirviendo de almacenamiento de productos metabólicos finales que posteriormente, como ocurre en Mesocestoides (Etges & Marinakis, 1991), sean excretados (mediante mecanismos aún no conocidos) al exterior.

2.1.4. CICLO BIOLÓGICO. DISTRIBUCIÓN

2.1.4.1. Ciclo biológico (ver Figura 3)

Echinococcus granulosus se desarrolla en un ciclo predador-presa, con un herbívoro u omnívoro como hospedador intermediario, y un carnívoro (perros, lobos, quizá también zorros, coyotes y dingos) como hospedador definitivo. Los gatos no parecen ser hospedadores definitivos adecuados (Thompson, 1977a).

Los huevos salen al exterior del hospedador definitivo junto con las heces del mismo. En el momento de su expulsión están probablemente en diferentes estadios de maduración, pudiendo completar su desarrollo en el exterior si las condiciones ambientales son favorables (Thompson, 1986; Gemmell & Lawson, 1986).

Es posible que alguno de los huevos se libere del anillo antes de salir al exterior del tubo digestivo (Yamashita *et al.*, 1956a). Una vez fuera, las contracciones del proglótide pueden ayudar a la expulsión de los huevos y a

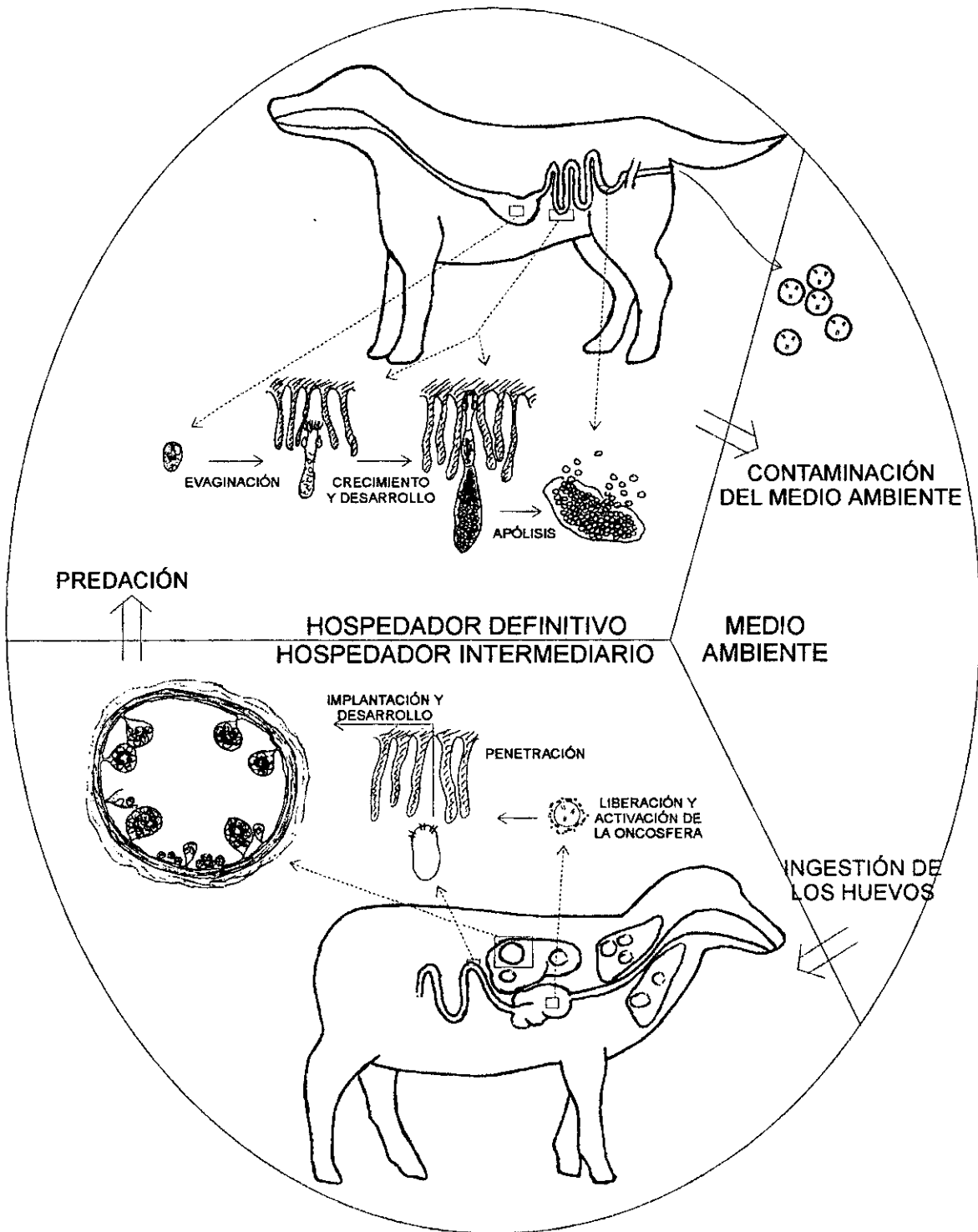
(1) Apoyando esta teoría está el hecho de que, en cultivos *in vitro*, uno de los primeros indicadores de desarrollo en dirección estrobilar es la paulatina reducción, hasta desaparecer completamente, del número de corpúsculos calcáreos (Smyth, 1967, 1979; Smyth & Davies, 1974; Macpherson & Smyth, 1985; Thompson *et al.*, 1990).

un alejamiento de los mismos de varios centímetros de la masa fecal (Matoff & Kolev, 1964). Diversos agentes externos (viento, lluvia, pájaros, insectos, etc.) pueden contribuir a la dispersión de los huevos en grandes extensiones (Crewe, 1967; Crewe & Crewe, 1969; Lawson & Gemmell, 1983, 1985, 1990; Gemmell & Lawson, 1986; Collins & Pope, 1990; Torgerson *et al.*, 1995).

Al ser ingeridos por un hospedador intermediario adecuado, los huevos se activan en el estómago y en el intestino delgado del individuo. Dicha activación es un proceso que consta de dos fases: la desagregación pasiva de los bloques que constituyen el embrióforo, en el estómago e intestino; y la activación de la oncosfera y su liberación de la membrana oncosférica (Lethbridge, 1980).

La desagregación de los bloques del embrióforo se produce gracias a la acción de las enzimas digestivas del estómago y/o del intestino, pero sin depender de ninguna en concreto. La oncosfera permanece inactiva durante este proceso, activándose por la acción de las sales biliares (éstas quizá originen cambios en la permeabilidad de la membrana oncosférica, actuando sinérgicamente con lipasas, lo que provocaría dicha activación -Lethbridge, 1980-). Es posible que la distinta composición de la bilis en distintas especies animales desempeñe un cierto papel en la especificidad del parásito por determinados hospedadores (Smyth, 1969). Sin embargo, éste no sería, en principio, el factor determinante, ya que Coman & Rickard (1975) observaron que la activación de los huevos de Taenia pisiformis, T. ovis y T. hydatigena también se puede producir en el intestino delgado del hospedador definitivo (perro). Por otro lado, la activación y liberación de la oncosfera puede también producirse en ausencia de las enzimas del aparato digestivo y de sales biliares: se han conseguido desarrollos de quistes en pulmones a partir de la inoculación experimental de huevos mediante traqueotomía en ovejas (Borrie *et al.*, 1965), o en hígado, cavidad peritoneal, pulmones y cavidad pleural, tras la inoculación de huevos por inyección intraperitoneal o por laparotomía en roedores (Williams & Colli, 1970; Colli & Williams, 1972; Kumaratilake & Thompson, 1981; Dempster *et al.*,

Figura 3 - Ciclo biológico de E. granulosus.



1991). En estos casos, la desagregación de los bloques embrioforales posiblemente haya sido debida a las enzimas hidrolíticas secretadas por los macrófagos y neutrófilos que participaran en la reacción inflamatoria contra los huevos del parásito (Thompson, 1986, 1995).

Una vez liberada y activada la oncosfera, ésta penetra en las vellosidades intestinales del yeyuno e íleo superior (Heath, 1971), fijándose posiblemente con los ganchos usándolos a modo de anclas. En un período de 30-120 minutos tras la activación, la oncosfera ha migrado a través del epitelio intestinal hasta llegar a la lámina propia del mismo (Lethbridge, 1980), gracias a movimientos del cuerpo y de los ganchos y a las secreciones de la glándula de penetración. Dichas secreciones es posible que tengan una actividad lítica, todavía no confirmada (Thompson, 1995); o bien puedan ayudar a la fijación de la oncosfera, actuar como un lubricante para facilitar el paso a través del epitelio intestinal, o proteger contra las enzimas digestivas o los factores inmunes producidos por el hospedador (Lethbridge, 1980; Fairweather & Threadgold, 1981). Como consecuencia de este proceso de penetración puede producirse la degeneración del tejido intestinal en las proximidades de la zona de invasión de la oncosfera (Heath, 1971).

Los factores que determinan tanto la especificidad por un hospedador intermediario determinado, como la localización final del metacestodo en dicho hospedador, no están claros, siendo probablemente debidos a características anatómicas y fisiológicas del hospedador, así como también a características propias del parásito (Heath, 1971; Lethbridge, 1980; Harris *et al.*, 1989).

Una vez que la oncosfera se asienta en un órgano, comienza rápidamente a desarrollarse hacia la formación del metacestodo, mediante el crecimiento y división de las células germinales de la oncosfera (Slais, 1973). Durante los 10-14 primeros días hay una activa proliferación celular, degeneración de los ganchos oncosferales, atrofia de la musculatura, vesiculización y formación de

la cavidad interna, y desarrollo de las capas germinal y laminar (Sakamoto & Sugimura, 1970; Heath & Lawrence, 1976; Harris *et al.*, 1989).

El desarrollo posterior es lento y variable, en función de una serie de factores (entre ellos, la cepa del parásito, la especie y cepa del hospedador, y la tasa de infestación); el crecimiento viene a ser de 1-5 cm. por año (Heath, 1973). Del mismo modo, el tiempo necesario para la formación de cápsulas prolíferas y/o de protoescólices es también muy variable: desde los 195 días obtenidos tras inoculación oral con huevos, en ratón, por Colli & Schantz (1974), hasta los 2 años obtenidos en ovejas por Gemmell *et al.* (1986a). Aunque Gemmell & Lawson (1986) indican que los quistes fértiles son mayores que los estériles de la misma edad, sugiriendo que el desarrollo de la fertilidad está asociado a una fase de crecimiento rápida, la formación de protoescólices no tiene en principio una relación estricta con el tamaño de los quistes, ya que no son siempre los quistes más grandes los que son fértiles (Sweatman & Williams, 1963; Heath, 1970; Colli & Schantz, 1974; Thompson, 1976). El período de vida de los quistes puede ser casi tan grande como la vida del hospedador; en caballos pueden vivir hasta 16 años (Ronéus *et al.*, 1982), habiéndose encontrado quistes de 53 años en humanos (Spruance, 1974).

El hospedador definitivo se infesta al ingerir protoescólices viables. En el estómago, con la ayuda de la pepsina, dichos protoescólices se liberan de las cápsulas prolíferas, eliminándose también otros restos de tejido larvario (Smyth, 1969a). La región apical de los protoescólices (ventosas y ganchos) permanece invaginada, protegida por el resto del cuerpo, el cual a su vez está protegido por una capa PAS+ (Marchiondo & Andersen, 1983). El proceso de evaginación del rostelo ha sido descrito por Marchiondo & Andersen (1984). No se conocen exactamente cuáles son los estímulos responsables de dicho proceso; la presencia de enzimas digestivas y/o de bilis no es esencial, aunque la tasa de evaginación aumenta en presencia de bilis (Smyth, 1967); lo mismo ocurre con variaciones en la temperatura, el pH o la presión osmótica, o con

agitación (De Rycke, 1968; Thompson, 1986, 1995; Thompson *et al.*, 1990); sin embargo, parece que la existencia de condiciones de aerobiosis sí es esencial (Smyth, 1969a).

El tiempo necesario para que se produzca la evaginación en el intestino del hospedador definitivo es variable, pudiendo llegar a ser de hasta 3 días (Thompson, 1977b). Una vez evaginados, los protoescólices están muy activos, disminuyendo dicha actividad durante los primeros 3-8 días, para luego volver a reaparecer (Smyth, 1967; Thompson, 1986). Este hecho posiblemente sea debido al consumo inicial de las reservas del protoescólex, posteriormente recuperadas una vez que el individuo se ha fijado al intestino.

Al cabo de 6 horas de la ingestión de los protoescólices, éstos ya empiezan a penetrar profundamente en las criptas de Lieberkühn (Thompson, 1977b), fijándose principalmente mediante las ventosas (Smyth *et al.*, 1969; Thompson *et al.*, 1979; Thompson & Eckert, 1983); los ganchos, aunque penetran sólo superficialmente en el epitelio intestinal, gracias a su forma actúan como anclas, contribuyendo a la fijación. Este proceso se produce, fundamentalmente, en el tercio anterior del intestino delgado (Lymbery *et al.*, 1989).

Siguiendo a Smyth *et al.* (1967), y Smyth & Davies (1974), el proceso de desarrollo es el siguiente: a los 3-4 días de la infestación, los canales excretores son evidentes, así como también una vesícula excretora localizada en el extremo posterior del cuerpo. El protoescólex crece y pierde los corpúsculos calcáreos; hacia los 11 días aparece una banda separando la zona del escólex del resto del cuerpo, originando, entre los 14-17 días, el septo que delimita el primer segmento. Entre 1 y 2 días después, en el interior de éste aparecen rudimentos genitales que comunican con el exterior mediante el poro genital, poco visible. Hacia los 20 días aparecen testículos rudimentarios en el primer proglótide, así como el bandeo que indica el comienzo de la formación de un segundo anillo. Para el día 28 ya se ha desarrollado el segundo anillo, habiéndose formado en

el primero la genitalia masculina y estando en desarrollo la femenina; tanto el cirro como la vagina se abren al exterior mediante un poro genital ya patente. En el día 33 el proglótide terminal está totalmente maduro; el penúltimo anillo está desarrollando la genitalia, y aparece el bandeo del tercer anillo. Entre los días 33-37 se produce la ovulación y fertilización en el anillo terminal, formándose, hacia los 37-45 días, un útero grávido con huevos embrionados. El penúltimo anillo está maduro, mientras que en el antepenúltimo se está desarrollando la genitalia. En estos momentos puede haber entre 3 y 5 anillos.

El desarrollo de Echinococcus en el hospedador definitivo presenta una gran variabilidad, observada entre especies de hospedador, entre individuos en el mismo hospedador, y entre diferentes regiones del intestino delgado (Thompson, 1995). Sin embargo, y a diferencia de otros cestodos, no se han detectado hasta el momento efectos de la sobrepoblación parasitaria sobre el desarrollo (Gemmell *et al.*, 1986a; Barriga & Al-Khalidi, 1991).

El individuo adulto puede presentar autofecundación (Smyth & Smyth, 1969), siendo los requisitos necesarios para que se produzca la misma muy complejos; posiblemente haya implicados diversos factores de las secreciones intestinales del hospedador definitivo que sean los que activen el cirro, y sin los cuales la autofecundación no se produciría (Smyth, 1982).

No se conoce con exactitud el tiempo que puede sobrevivir el parásito en el intestino del hospedador definitivo, oscilando entre 6 meses y más de 2 años (Sweatman & Williams, 1963; Schantz, 1982). Se ha estimado que la tasa de producción y liberación de anillos grávidos es del orden de uno cada 7-14 días (Gemmell, 1962; Smyth, 1964; Schantz, 1982); sin embargo, Yamashita *et al.* (1956a) observaron diferencias de entre 4 y 6 semanas entre la primera y la segunda aparición de huevos en las heces.

2.1.4.2. Ciclos epidemiológicos (ver Figura 4)

Se han reconocido dos formas biológicas (Rausch, 1986) o biotipos (Rausch, 1995) del parásito, en base a diferencias en la especificidad del estadio larvario por el hospedador (Rausch, 1967), así como por sus características de desarrollo, patogenicidad y respuesta inmune provocada en el hombre (Wilson *et al.*, 1968): un *biotipo norteco* y un *biotipo europeo*¹ (Rausch, 1995).

El *biotipo norteco* es indígena de las zonas holárticas de tundra y taiga, pudiendo en ocasiones darse en latitudes inferiores. Según Rausch (1986, 1995), ésta sería la forma ancestral a partir de la cual se desarrolló el *biotipo europeo*, adaptada a hospedadores sinantrópicos con el desarrollo de la ganadería. Durante los siglos XV-XVIII, gracias a las conquistas y colonizaciones europeas, esta *forma europea* se distribuyó por todo el mundo.

Siguiendo a Rausch (1986, 1995), el *biotipo norteco* afecta exclusivamente a ungulados de la familia Cervidae, no desarrollándose en ungulados domésticos (salvo renos domesticados); el hospedador definitivo serían lobos y, ocasionalmente, perros.

Este biotipo se perpetúa en varios ciclos epidemiológicos. El principal se desarrolla entre cérvidos salvajes y lobos, pudiendo ser éstos sustituidos, en Norteamérica, por coyotes. Un segundo ciclo se produciría entre ungulados salvajes y perros, al comer éstos los restos dejados por los cazadores nómadas. Un tercer ciclo se produciría entre los cérvidos de los rebaños transhumantes y lobos. El cuarto ciclo, el más importante para el hombre por su carácter "doméstico", se mantendría entre los perros empleados en el pastoreo de los renos, y éstos.

(1) En el presente trabajo, todos los datos se entenderán referidos al *biotipo europeo*, salvo mención expresa.

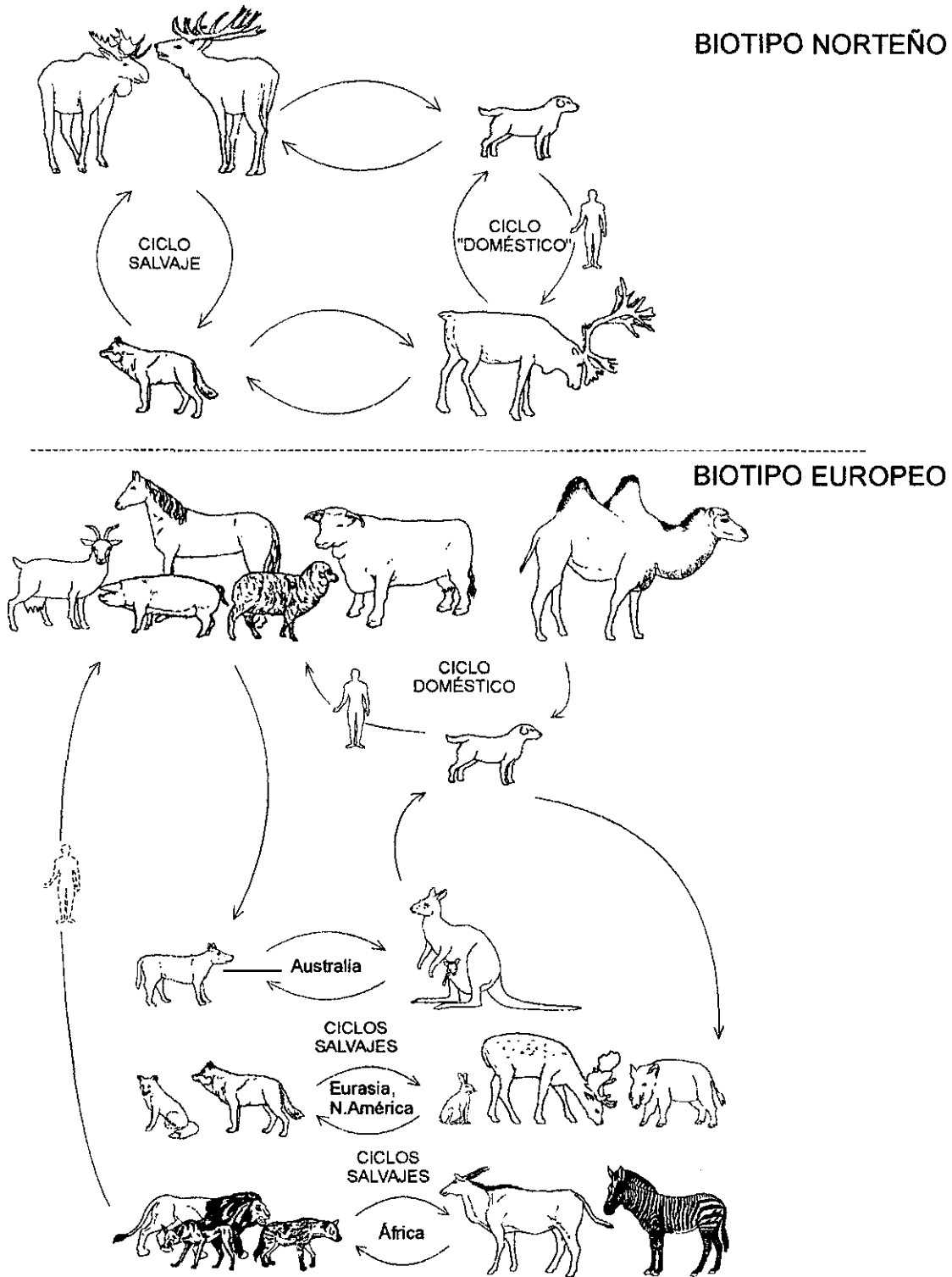


Figura 4 - Ciclos epidemiológicos de *E. granulosus* (a partir de Schantz *et al.*, 1972; Thompson, 1977; Thompson & Kumaratilake, 1982a; Macpherson, 1983; Rausch, 1986).

Las siluetas humanas indican los ciclos epidemiológicos que afectan al hombre (línea continua), o que han sido propuestos en tal sentido (línea discontinua).

El término *biotipo europeo* se aplica al parásito cuyo ciclo afecta principalmente a hospedadores sinantrópicos, no implicando un origen geográfico determinado, dado que el desarrollo del parásito en ciclos sinantrópicos se ha debido producir en diferentes momentos y lugares durante el desarrollo de la ganadería en Eurasia y África.

En este *biotipo europeo* pueden distinguirse varios tipos de ciclos epidemiológicos, según los hospedadores a los que afecta. El ciclo sinantrópico *sensu stricto* es el más importante, siendo perpetuado entre ungulados domésticos y perros; éstos son el único hospedador final importante en la mayoría de las regiones en las que el parásito está presente. Prácticamente cualquier especie de ungulado doméstico puede servir como hospedador intermediario, siendo la importancia relativa de cada especie variable según las prácticas ganaderas de cada región (Rausch, 1986, 1995). En España son las ovejas, vacas, cerdos, cabras y équidos los que actúan como hospedadores intermediarios, siendo las ovejas, como en otras partes del mundo, las más importantes para el mantenimiento del ciclo.

Además del ciclo sinantrópico *sensu stricto*, en distintas partes del mundo pueden presentarse otros ciclos epidemiológicos que afectan parcial o completamente a animales salvajes, si bien la importancia de estos ciclos es en general mínima en comparación con el ciclo doméstico:

- zorros (gen. Vulpes)/ungulados domésticos, en las Islas Británicas (Thompson, 1977);
- zorros (gen. Dusicyon)/liebres (Lepus europaeus), en Argentina (Schantz *et al.*, 1972);
- carnívoros salvajes (hienas, chacales, incluso leones) y perros domésticos/ungulados domésticos y salvajes, en África (revisado por Rausch, 1986, 1995);
- dingos/macrópodos, en Australia (Thompson & Kumaratilake, 1982a).

El hombre es, en general, un "saco ciego" en el ciclo del parásito, infestándose de forma accidental; en ocasiones, las costumbres de la población aumentan considerablemente el riesgo de contagio (es el caso de, p.e., los emigrantes vascos en California -Araujo *et al.*, 1975-, los maoríes en Nueva Zelanda -Burridge & Schwabe, 1977-, o los esquimales -Rausch, 1995-). En Kenia, sin embargo, el hombre puede formar epidemiológicamente parte del ciclo: debido a la costumbre de algunas tribus de enterrar a poca profundidad, o no enterrar, los cadáveres, éstos son accesibles para una gran variedad de carnívoros, de modo que una persona muerta por causa de la hidatidosis puede ser una importante fuente de infestación para dichos carnívoros y juegue por tanto un papel activo en el ciclo del parásito (Macpherson, 1983).

2.1.4.3. Distribución

E. granulosus es de distribución cosmopolita, presentándose bajo cualquier condición climática, desde el Ártico hasta el extremo sur de Suramérica y Nueva Zelanda.

Siguiendo a Rausch (1986, 1995), el *biotipo norteco* está presente en Norteamérica al norte del paralelo 45°N, bien separado geográficamente del *biotipo europeo*; sin embargo, en Eurasia, la situación es más compleja, pues el *biotipo norteco*, localizado de forma continua a lo largo de la zona norte, se extiende hasta Europa central y del sur y a través de la antigua Unión Soviética, en donde pueden coexistir ambas formas. No parece que se haya extendido a otras zonas del mundo tras la introducción en otras regiones de animales potencialmente infestados procedentes de Eurasia y Norteamérica.

El *biotipo europeo* tiene una distribución cosmopolita, consecuencia de la baja especificidad por el hospedador intermediario, y por las sucesivas y repetidas introducciones de ganado doméstico desde Europa a otras partes del

mundo (Thompson & Allsopp, 1988). El ciclo epidemiológico principal (perro-oveja) está presente en los cinco continentes, constituyendo una parasitosis endémica en algunas regiones: cuenca mediterránea, zonas de la antigua URSS, centro y norte de China, Suramérica, este de África y este y sur de Australia (Gemmell, 1960, 1979; Matossian *et al.*, 1977; Nozais, 1989; Euzèby, 1990, 1991; Craig *et al.*, 1991).

El resto de los posibles ciclos epidemiológicos pueden coexistir con el principal, presentándose con importancia local en algunas regiones: el ciclo perro-cerdo es común en Europa oriental, norte de Suramérica y sur de EE.UU. (Schantz, 1982); el perro-vaca, en Suiza y quizá también Suráfrica (Thompson *et al.*, 1984); y el ciclo perro-caballo, en las Islas Británicas (Thompson & Smyth, 1975; Kumaratilake *et al.*, 1986).

2.1.5. PATOLOGÍA. DIAGNÓSTICO, TRATAMIENTO Y CONTROL

2.1.5.1. Patología

Los daños causados por los vermes adultos se limitan a la zona de fijación al intestino del hospedador definitivo, en donde pueden originar la necrosis de las células a las cuales se adhieren las ventosas (Thompson *et al.*, 1979), o la ruptura del epitelio de una cripta de Lieberkühn, con liberación de células del hospedador en la cripta (Smyth *et al.*, 1969). En infestaciones masivas puede provocarse la producción excesiva de mucus, pero en general no suelen observarse daños importantes ni reacciones celulares contra el parásito (Thompson *et al.*, 1979; Thompson & Eckert, 1983).

Respecto a la fase larvaria, ningún otro parásito provoca lesiones en tantas localizaciones anatómicas como las que produce *E. granulosus*. Sin

embargo, la mayoría de las veces la localización es hepática y/o pulmonar: Schantz (1972), tras revisar los datos publicados de 30.000 casos humanos, encontró que el 81-87% de los quistes eran de localización hepática o pulmonar, y sólo el 13-19% se hallaron en otros órganos. Otros autores dan valores similares (Thompson, 1977; Dew, 1937, citado por Smyth & Heath, 1970).

La mayor parte de los estudios realizados sobre la patología de la hidatidosis se han hecho sobre humanos, siendo muy posible que los datos clínicos obtenidos de éstos sean extrapolables a los animales (Schwabe, 1986). Los principales problemas causados por la hidatidosis son principalmente de tipo mecánico, causados por el tamaño y crecimiento de los quistes (Pawlowski, 1993, citado por Ammann & Eckert, 1995). Así, por ejemplo, la mayoría de los quistes hepáticos son asintomáticos, no presentando problemas clínicos hasta que alcanzan un tamaño de unos 10 cm. (Arme *et al.*, 1983). La ruptura de los quistes puede ocurrir en cualquier localización, provocando infecciones bacterianas secundarias y/o la diseminación de protoescolices por el organismo (lo que originará una hidatidosis secundaria múltiple), reacciones anafilácticas de intensidad variable (Jakubowski & Barnard, 1971), e incluso la muerte del hospedador (Schantz, 1977).

A nivel bioquímico y metabólico se pueden producir cambios en varios sistemas enzimáticos, en niveles de vitaminas, minerales y gammaglobulinas, y en el metabolismo proteico, indicando la existencia de una alteración funcional del órgano afectado (revisado por Arme *et al.*, 1983). Ramazanov (1978) encontró también un efecto negativo de la hidatidosis sobre la fecundidad de las ovejas y la tasa de crecimiento de los corderos nacidos de animales parasitados.

2.1.5.2. Diagnóstico

El adulto ocasiona problemas de escasa importancia, limitados a la zona de fijación del escólex; el hospedador definitivo permanece en muchos casos asintomático; aun cuando el número de vermes sea elevado. Dado que los huevos de los ténidos son morfológicamente muy similares, los análisis coprológicos no son válidos para realizar un diagnóstico fiable de equinococosis, por lo que, en diversos estudios epidemiológicos, el diagnóstico se ha basado en el análisis de purgas realizadas con bromhidrato de arecolina.

A nivel de inmunodiagnóstico, dos son las aproximaciones que se han seguido: detección de anticuerpos del hospedador, o detección de componentes parasitarios en las heces del hospedador. Respecto a la primera aproximación, en extractos fecales, Al-Khalidi (1982) encontró una elevación en los niveles de IgA e IgM; sin embargo, prácticamente todos los estudios se han dirigido hacia la detección serológica, encontrándose diversos anticuerpos específicos frente al verme adulto (Movsesijan & Mladenovic, 1971; Barriga & Al-Khalidi, 1986; Singh & Dhar, 1988a; Sixl *et al.*, 1988). Recientemente, Gasser y colaboradores (Gasser *et al.*, 1988, 1990, 1992, 1993; Jenkins *et al.*, 1990) han intentado poner a punto un test serológico para la detección de anticuerpos séricos; sin embargo, la sensibilidad del mismo es pequeña (algunos perros con una gran cantidad de vermes han sido negativos para este test) y la especificidad no está todavía comprobada.

La detección de componentes parasitarios en las heces se basa en la detección de estructuras o de antígenos parasitarios mediante técnicas inmunológicas, pero en ningún caso en relación con la inmunogenicidad que el parásito pueda tener hacia el hospedador. Craig *et al.* (1986, 1988) detectaron, mediante anticuerpos específicos, huevos de Echinococcus en las zonas perianales del hospedador, o en muestras ambientales; sin embargo, la sensibilidad se ve

afectada por la periódica ausencia de huevos en las heces (Craig *et al.*, 1988). Allan *et al.* (1992) y Deplazes *et al.* (1992) detectaron coproantígenos de Echinococcus en heces, siendo esta técnica mucho más sensible que la detección serológica de anticuerpos (Walters & Craig, 1992; Craig *et al.*, 1994, en prensa, citados por Lightowlers & Gottstein, 1995).

Respecto a la fase larvaria, debido al lento crecimiento de los quistes y a su baja patogenicidad *per se*, éstos puede permanecer en el hospedador durante mucho tiempo, siendo detectados sólo cuando tienen un efecto mecánico sobre alguna función corporal, se produce una reacción alérgica aguda como consecuencia de una rotura accidental de los mismos, o bien se determina su presencia en análisis realizados por otros motivos clínicos, o en análisis *post mortem*.

Aunque en el caso de algunos quistes pulmonares, o de quistes abiertos a las vías biliares o urinarias, pueden detectarse restos del parásito (fragmentos de membranas, protoescolices o ganchos) en el esputo, el contenido duodenal o el sedimento urinario, respectivamente (Bilbao, 1985), el diagnóstico etiológico de la hidatidosis es normalmente difícil de realizar. Los métodos de exploración no invasivos (sonografía, tomografía axial computerizada, resonancia magnética nuclear), normalmente empleados en pacientes humanos, pueden determinar el tamaño y localización de una lesión voluminosa, pero sin permitir, en muchos casos, un diagnóstico preciso de su naturaleza (Rickard & Lightowlers, 1986). Sin embargo, algunos autores consideran estas técnicas como de gran precisión para establecer el diagnóstico, sobre todo en quistes hepáticos, aunque puedan en ocasiones ser difíciles de interpretar (caso de la resonancia magnética nuclear) (Niron & Ozer, 1981; Beggs, 1983, 1985; Sun *et al.*, 1988; Frider *et al.*, 1990; Guerra *et al.*, 1990; Di Palma *et al.*, 1991; Munzer, 1991). Estas técnicas de exploración suelen emplearse para realizar el seguimiento de la evolución quística tras tratamientos quimioterápicos (Miguet *et al.*, 1989).

Los métodos invasivos (punciones, aspiraciones, biopsias) son peligrosos, debido al riesgo de ruptura del quiste, con el consecuente choque anafiláctico y/o diseminación de protoescólices (lo que originará quistes secundarios en diversas localizaciones), así como al riesgo de infecciones asociadas a tales prácticas (Morris & Richards, 1992, citados por Ammann & Eckert, 1995). Es por ello que se recurre normalmente a un diagnóstico serológico (inmunológico) para determinar la presencia del parásito (en ocasiones, conjuntamente con técnicas sonográficas -Bchir *et al.*, 1991; Gottstein, 1992-). Aparte de la serología, la única técnica de laboratorio que puede ser de ayuda es la determinación de la eosinofilia y los niveles de IgE en los casos de quistes rotos con manifestaciones alérgicas (Gottstein & Reichen, 1994, citados por Lightowlers & Gottstein, 1995).

En este sentido, la mayoría de los estudios realizados se han hecho para desarrollar técnicas serológicas diagnósticas en humanos, siendo pocas las técnicas desarrolladas para animales, a pesar de su potencial interés en los programas de control.

Como fuente de antígenos se ha empleado líquido hidatídico, protoescólices y membranas. Los principales antígenos empleados en inmunodiagnóstico son el antígeno 5, o antígeno A (descrito por Chordi & Kagan, 1965; Capron *et al.*, 1967) y el antígeno B (descrito por Chordi & Kagan, 1965). El antígeno 5 se localiza en la porción interna de la membrana germinal, pared de las cápsulas prolíferas y parénquima de los protoescólices; y el antígeno B, en el tegumento, subtegumento y corpúsculos calcáreos de los protoescólices, en las cápsulas prolíferas, y en las membranas laminar y germinal (Yarzabal *et al.*, 1976, 1977; Rickard *et al.*, 1977; Davies *et al.*, 1978).

Las técnicas utilizadas para el inmunodiagnóstico de la hidatidosis han sido la prueba de Casoni, el test de fijación del complemento, inmunofluorescencia, doble difusión, inmunoelectroforesis, aglutinación de látex, hemaglutinación

indirecta, inmunoblot y ELISA (revisado por Rickard & Lightowlers, 1986; Lightowlers & Gottstein, 1995), aunque sólo algunas se han mostrado lo suficientemente sensibles y específicas.

La obtención del arco 5 (línea de precipitación característica de la hidatidosis, obtenida mediante inmunolectroforesis), identificado por Capron *et al.* (1967), es considerada como una de las pruebas de serodiagnóstico más específica para E. granulosus, aunque la técnica es poco sensible y presenta el problema no sólo de la aparición de falsos negativos, sino también de falsos positivos (se han encontrado anticuerpos frente al antígeno 5 en pacientes con neurocisticercosis -Varela-Díaz *et al.*, 1978; Moro *et al.*, 1992- y con hidatidosis alveolar -Varela-Díaz *et al.*, 1977; Schantz & Gottstein, 1986-). Sin embargo, esta prueba, junto con el ELISA, se sigue empleando como método de rutina.

Algunos autores han descrito variaciones de la técnica ELISA como métodos más sensibles y específicos; así, Zheng *et al.* (1986), aplicando el DOT-ELISA, afirman que el método es sensible, específico, económico y rápido; Dematteis *et al.* (1989) emplean el DIG-ELISA, con mayor sensibilidad y especificidad que el ELISA convencional, y con la ventaja adicional de que los resultados no tienen que medirse por colorimetría, por lo que hace a este método más aplicable a estudios de campo.

Para el seguimiento post-quirúrgico se emplea la detección de IgE específicas, ya que a los 6 meses disminuye su nivel. Rombert (1984) propone el RAST como método de detección de estas inmunoglobulinas, y Hugier *et al.* (1987) señalan como alternativa la técnica de degranulación de basófilos.

En lo que respecta al diagnóstico de la hidatidosis animal, son pocos los logros conseguidos (revisado por Lightowlers & Gottstein, 1995). Se han analizado varios tests serológicos (hemaglutinación, doble difusión, inmunolectroforesis, ELISA, ...), encontrándose siempre problemas debidos a la baja sensibilidad

de la técnica empleada y/o a la existencia de reacciones cruzadas con otras parasitosis. En España, Cuesta Bandera *et al.* (1982) y Cuesta Bandera (1985), comparando las técnicas de hemaglutinación indirecta, ELISA e inmunoelectroforesis, encuentran a esta última como la prueba más específica en el diagnóstico de la hidatidosis ovina, con una correlación del 89% con los resultados de las necropsias, sin haber observado falsos positivos, y con falsos negativos sólo en animales con quistes escasos, pequeños y/o degenerados.

2.1.5.3. Tratamiento

La extirpación quirúrgica de un quiste permanece como tratamiento de elección de la hidatidosis, quedando la quimioterapia para los casos total o parcialmente inoperables (WHO, 1992). Sin embargo, la cirugía presenta riesgos, algunos inherentes a la técnica (infecciones, posibles alteraciones fisiológicas debidas al anestésico, daños fortuitos en órganos internos, etc.), y otros debidos al parásito (posibilidad de choque anafiláctico y riesgo de hidatidosis secundaria diseminada). Aunque puede ser realizada en casi el 90% de los pacientes (Mentha *et al.*, 1991), los elevados costes de operación y tratamiento post-operatorio, la posibilidad de recidivas (2-25% de los casos), las complicaciones y la mortalidad asociadas (revisado por Ammann & Eckert, 1995), y el hecho de que la localización o la extensión del quiste lo hace en ocasiones virtualmente inoperable, son motivos que promueven la búsqueda de tratamientos farmacológicos alternativos.

No existe, hasta el momento, un fármaco efectivo al 100% contra la hidatidosis. La quimioterapia ha sido efectiva total o parcialmente en algunos casos, no en todos, y siempre tras altas dosis y/o largos períodos de tratamiento. En ocasiones se suele emplear conjuntamente con la cirugía, como tratamiento pre- o post-operatorio complementario.

Los fármacos que hasta el momento se han mostrado más efectivos en el tratamiento de la hidatidosis son derivados bencimidazólicos (albendazol, mebendazol, luxabendazol, etc.), en ocasiones administrados conjuntamente. También se emplea praziquantel, pero todavía no hay resultados concluyentes.

Respecto a albendazol y mebendazol, su eficacia es variable, habiendo numerosos casos descritos en la literatura médica sobre la mayor o menor eficacia de cada uno. Son sustancias poco solubles en agua, y con una absorción intestinal baja (en torno al 10%, según Brugmans *et al.*, 1971). Sin embargo, estos niveles de absorción pueden aumentarse disminuyendo el tamaño de partícula (Gemmell & Johnstone, 1981) o modificando la dieta (Münst *et al.*, 1980). Los niveles de fármaco en sangre son muy variables, en función de características propias de cada individuo, entre ellas las funciones hepática y renal (Bryceston *et al.*, 1982; Witassek & Bircher, 1983; Gottschall *et al.*, 1990), por lo que las dosis deben ajustarse según las condiciones de cada paciente. Parece ser que es necesario una concentración plasmática en torno a los 100 ng/ml, durante largos períodos de tiempo (meses, incluso años), para obtener el efecto antihelmíntico deseado (Witassek *et al.*, 1981). La posibilidad de efectos secundarios, en ocasiones graves, pueden obligar a la supresión del tratamiento.

2.1.5.4. Control

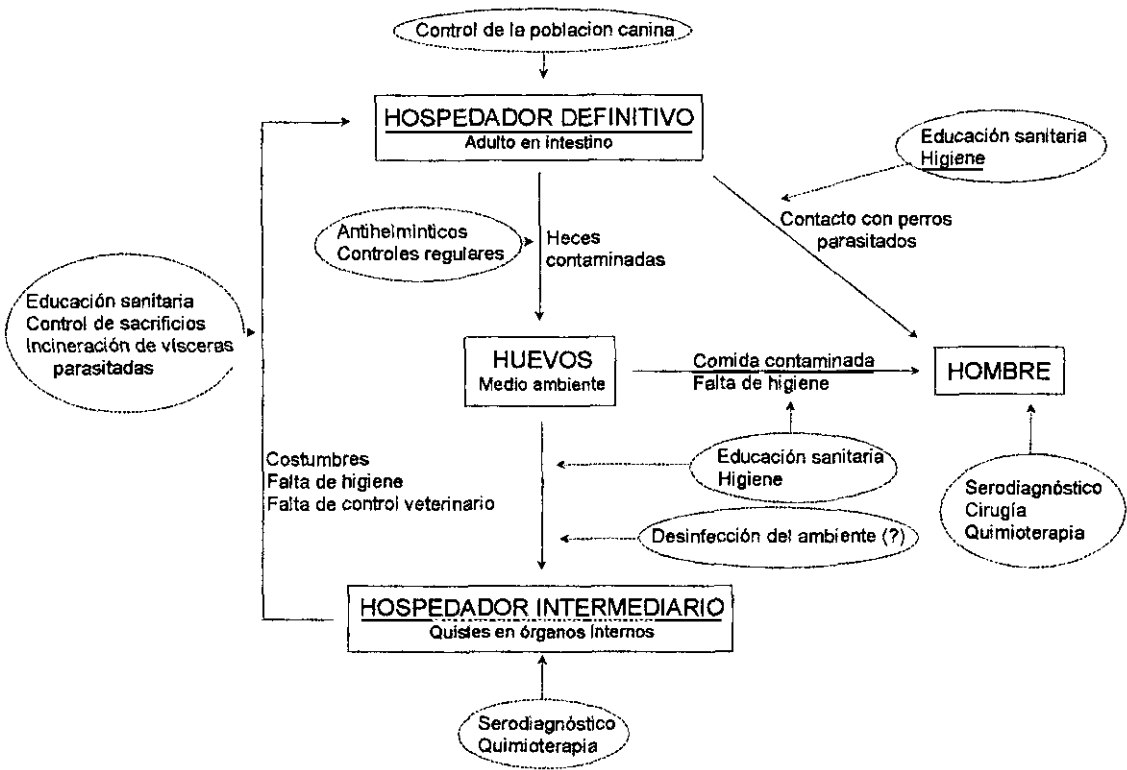
El objetivo principal del control de la hidatidosis es la reducción de su prevalencia, tanto en el hospedador definitivo como en el intermediario, hasta unos niveles lo suficientemente bajos como para que se interrumpa la transmisión. Dado que el ciclo doméstico de E. granulosus es, debido a su distribución y a sus repercusiones sanitarias y económicas, el más importante para el hombre, los distintos programas de control se centran sobre el mismo.

En general, todas las medidas preventivas a tomar deben conducir a la reducción del potencial reproductivo básico de E. granulosus. La aplicación de dichas medidas, incidiendo sobre varias fases del ciclo biológico del cestodo, deberán ser simultáneas si se desea que se pierda la estabilidad del complejo sistema parásito-hospedador. Los puntos del ciclo sobre los que se pueden aplicar medidas de prevención y control vienen recogidos en la Figura 5. Por el momento, el ciclo sólo puede romperse de forma efectiva en el paso de la larva al adulto, evitando que los perros se alimenten con vísceras parasitadas; o impidiendo que los vermes se desarrollen hasta el estado adulto en el intestino del perro, tratando a éste con un antihelmíntico (praziquantel) a intervalos de tiempo regulares. Parece ser que sólo es necesario atacar una fase del ciclo para desestabilizar totalmente la dinámica de poblaciones de este parásito (Gemmell & Lawson, 1986).

Hasta el momento, el control efectivo de la parasitosis se ha conseguido en varias campañas de control (Gemmell & Lawson, 1986; Gemmell *et al.*, 1986a). Entre los principales factores que contribuyen al éxito de dichas campañas están los programas de educación sanitaria, así como el seguimiento de los niveles de infestación en perros, ganado y humanos (Schantz, 1982). Del mismo modo, las razones que han provocado la falta de éxitos en algunas campañas de control han sido el bajo nivel cultural de la población, la existencia de poblaciones caninas grandes e incontroladas, la gran extensión geográfica de la zona de acción de la campaña, y la existencia de relaciones entre ciclos salvajes y domésticos del parásito (Schantz, 1982).

Para desarrollar una estrategia de control apropiada, para una región en concreto, deben tenerse en cuenta todas las variables epidemiológicas conocidas, incluyendo factores socioculturales locales relacionados con la transmisión del parásito. También deben preverse la estructura administrativa de la autoridad encargada de la campaña, el desarrollo de un programa de monitorización para conocer los progresos de las medidas aplicadas, y la consecución de los fondos

Figura 5.- Ciclo del parásito y puntos del mismo en que sería posible aplicar medidas de prevención y control .



económicos necesarios para asegurar la puesta en marcha completa de todas las fases del programa. La OMS (WHO, 1981) ha promovido la elaboración de una guía práctica para el planteamiento, desarrollo, implantación y evaluación de programas de control sobre la hidatidosis.

En nuestro país se están desarrollando varios programas de control de la equinocosis/hidatidosis en distintas Comunidades Autónomas (Aragón, Castilla-La Mancha, Castilla-León, Extremadura, Madrid, Navarra y La Rioja), habiéndose obtenido, durante los primeros años de implantación de los mismos, resultados esperanzadores (ver el apartado 2.2.6.1. - *Prevalencia e incidencia de la Hidatidosis en España*).

2.2. ESPECIACIÓN EN Echinococcus granulosus

2.2.1. ANTECEDENTES. TAXONOMÍA Y TERMINOLOGÍA DENTRO DEL GÉNERO Echinococcus

La taxonomía del género Echinococcus, tanto a nivel específico como subespecífico, es un tema controvertido y objeto de cierta confusión. Entre 1910 y 1972 se llegaron a describir, dentro del género, 16 especies y 13 subespecies distintas (10 de E. granulosus y 3 de E. multilocularis) (Tabla 1), basándose en diferencias morfológicas, en su hallazgo en hospedadores distintos de los considerados como naturales, y en el origen geográfico de los mismos. Actualmente sólo se reconocen como válidas 4 especies dentro del género Echinococcus, con 2 subespecies en E. granulosus y 2 ó 3 (según los autores) en E. multilocularis, habiendo sido invalidadas todas las demás en base, fundamentalmente, a reevaluaciones de las diferencias morfológicas y biológicas que condujeron a su descripción, o a la ausencia de segregación geográfica o ecológica (Rausch, 1953, 1967; Vogel, 1957; Rausch & Nelson, 1963; Schantz *et al.*, 1975, 1976; Krotov, 1979; Kumaratilake & Thompson, 1982a).

Al ser invalidada la categoría taxonómica de aquellas poblaciones con determinadas características diferentes de las especies (o subespecies) establecidas, podría llegar a obviarse la importancia y la significación de la variabilidad presente en Echinococcus (Kumaratilake & Thompson, 1982a; Thompson, 1986, 1995). Muchas de las poblaciones a las que se les retiró su status taxonómico poseen características claramente definidas y distintas; incluso se ha propuesto la posibilidad de que algunas de las subespecies invalidadas pudieran estar reproductivamente aisladas y representaran una especie crípticas (Rausch, citado por Schantz, 1982; Thompson & Lymbery, 1988; Thompson *et al.*, 1994). Dado que, por debajo del rango de especie, el Código Internacional de Nomenclatura Zoológica sólo regula los nombres de las subespecies, Smyth & Smyth

Tabla 1 - Especies y subespecies descritas dentro del género Echinococcus.

<u>Especie válida</u>	<u>Subespecies</u>	<u>Sinonimias</u>
<u>E. granulosus</u> (Batsch, 1786)		<u>E. longimanubrius</u> Cameron, 1926 <u>E. patagonicus</u> Szidat, 1960 <u>E. cepanzoi</u> Szidat, 1971 <u>E. intermedius</u> López Neyra & Soler, 1943 <u>E. minimus</u> Cameron, 1926
	<u>E.g. granulosus</u> Verster, 1965 <u>E.g. canadensis</u> Webster & Cameron, 1961 <u>E.g. equinus</u> William & Sweatman, 1963 <u>E.g. ortleppi</u> (López-Neyra & Soler, 1943) <u>E.g. felidis</u> (Ortlepp, 1937) <u>E.g. lycaontis</u> (Ortlepp, 1934) <u>E.g. africanus</u> Verster, 1965 <u>E.g. borealis</u> Sweatman & Williams, 1963 <u>E.g. newzealandensis</u> (Sweatman & Williams, 1963) <u>E.g. dusicyontis</u> Blood & Lelijveld, 1969	<u>E. cameroni</u> Ortlepp, 1934 <u>E. ortleppi</u> López Neyra & Soler, 1943 <u>E. felidis</u> Ortlepp, 1937 <u>E. lycaontis</u> Ortlepp, 1934
<u>E. multilocularis</u> Leuckart, 1863	<u>E.m. multilocularis</u> Vogel, 1957 <u>E.m. kazakhensis</u> Shul'ts, 1961 <u>E.m. sibiricensis</u> (Rausch & Schiller, 1954)	<u>E. sibiricensis</u> Rausch & Schiller, 1954
<u>E. oligarthrus</u> (Diesing, 1863)		<u>E. cruzi</u> Brumpt & Joyeaux, 1924 <u>E. pampeanus</u> Szidat, 1967
<u>E. vogeli</u> Rausch & Berstein, 1972		<u>E. cruzi</u> Brumpt & Joyeaux, 1924

Las subespecies en negrilla son las actualmente aceptadas como válidas.

(1964) propusieron que dichas poblaciones fuesen referidas como variantes, razas o cepas; Rausch (1967) sugirió que diferentes poblaciones, incluso las subespecies invalidadas, deberían ser denominadas cepas o formas. El término cepa es actualmente aceptado para referirse a las variantes intraespecíficas de

status taxonómico incierto (Thompson, 1986); incluso las subespecies que son taxonómicamente válidas han sido también denominadas cepas¹.

La constatación a distintos niveles de diferencias entre muestras procedentes de distintos hospedadores y/o de diferentes orígenes geográficos llevó a la OMS a reconocer oficialmente la existencia de variantes intraespecíficas en Echinococcus granulosus, indicando que éstas deberían designarse como cepas hasta que su papel biológico, ecológico y epidemiológico fuese clarificado (WHO, 1981). En este sentido, se remarca la necesidad de ampliar los criterios de diferenciación y caracterización de dichas cepas.

Sin embargo, el término *cepa*, debido a su naturaleza informal, carece de precisión, y dado que casi nunca ha sido explícitamente definido, diferentes autores parecen usar el término con diferentes significados. Consideramos la definición dada por Thompson & Lymbery (1988) como la más adecuada; según estos autores, la definición ideal de cepa de Echinococcus sería "... a group of individuals which differs statistically from other groups of the same species in one or more genetically determined characters of actual or potential significance to the epidemiology and control of hydatid disease. ..." (Thompson & Lymbery, 1988, pag. 226). Sin embargo, ante la dificultad de determinar el componente genético en la variación de los caracteres concretos que posean una significación práctica (los cuales son con frecuencia complejos, con mecanismos de herencia normalmente no conocidos y con una expresión fenotípica muy influida por factores ambientales), es más operativa la definición de cepa como "... a group of individuals which differs statistically from other groups of the same species in gene frequencies, and in one or more characters of actual or potential significance to the epidemiology and control of hydatid disease. ..." (Thompson

(1) E. g. canadensis es también designada como la forma nortea (WHO, 1981), o cepa silvestre (FAO, 1982) de E. granulosus, mientras que E. g. granulosus es designada como la forma europea (Rausch, 1986); E. m. multilocularis y E. m. sibiricensis son también conocidos como la cepa de Europa Central (Vogel, 1977) y la cepa de St. Lawrence (Rausch & Berstein, 1972) de E. multilocularis, respectivamente.

& Lymbery, 1988, pag. 227). Como consecuencia de esta definición se deduce lo siguiente (Thompson & Lymbery, 1988):

1. Una cepa puede incluir una o más poblaciones (p.e., la cepa ovina está formada por poblaciones que infestan ovejas en diferentes países de todo el mundo; aunque el intercambio genético entre dichas poblaciones es, obviamente, muy reducido o nulo, y aunque las mismas difieran en sus frecuencias génicas, mientras no se encuentren diferencias en caracteres de significación práctica no serán consideradas como cepas diferentes).
2. Las subespecies descritas pueden o no ser consideradas como cepas (p.e., en E. multilocularis, las poblaciones europeas y norteamericanas han sido taxonómicamente descritas como subespecies distintas -E. m. multilocularis y E. m. sibiricensis, respectivamente- debido a sus diferencias morfológicas y a su separación geográfica; sin embargo, no hay todavía evidencias claras de diferencias entre ellas en caracteres de significación práctica, por lo que no deben ser descritas como cepas diferentes).
3. La especificidad por un hospedador determinado no es necesariamente una característica distintiva de cepas (p.e., en Tasmania se ha encontrado una cepa ovina con características morfológicas, bioquímicas y de desarrollo diferentes de la cepa ovina de Australia continental).

2.2.2. FACTORES QUE INFLUYEN EN EL FENÓMENO DE ESPECIACIÓN DE Echinococcus granulosus

La variación intraespecífica encontrada en Echinococcus ha intentado ser explicada en base a dos modelos contrapuestos, uno debido a J.D. Smyth y otro debido a R.L. Rausch.

Según el modelo de Smyth (Smyth & Smyth, 1964), la combinación de autofecundación en el adulto y de producción de individuos clónicos en la reproducción asexual del metacestodo confiere a estos parásitos posibilidades de especiación simpátrica, ya que una mutación producida en un adulto podría ser transmitida a su descendencia, dando lugar a embriones hetero- y homocigóticos que, si consiguen establecerse en un hospedador intermediario, originarán, por reproducción asexual, un clon de numerosos individuos genéticamente idénticos. De este modo, las mutaciones pueden llegar a expresarse, aunque sean recesivas, y si no son de alguna manera seleccionadas en contra por el hospedador intermediario, podrán irse extendiendo cada vez más. El clon de individuos mutantes que de este modo aparece puede ser reconocido como una cepa nueva, si presenta suficientes diferencias con la población original.

Este modelo estaría de acuerdo con la teoría de Price (1977, 1980), que predice, para las poblaciones parásitas que sean relativamente homocigóticas y con un pequeño número de intercambios genéticos, una estructura genética dividida en razas especializadas y en especies gemelas o crípticas. En general, esta predicción no se ha verificado empíricamente, pero E. granulosus podría ser una excepción que siguiese estas reglas.

Este modelo ha sido aceptado por numerosos autores para explicar la variación subespecífica en Echinococcus (McManus & Smyth, 1979, 1986; Thompson, 1979, 1986; Macpherson & McManus, 1982; McManus & Simpson, 1985; Bryant & Flockhart, 1986; entre otros). Kumaratilake & Thompson (1982a) y Kumaratilake *et al.* (1986) piensan que este modelo es válido para E. granulosus, pero no para E. multilocularis, que puede tener un comportamiento reproductor diferente y una variación intraespecífica menor.

Según el modelo expuesto por Rausch (Rausch 1967a,b, 1985, 1986), las distintas especies y subespecies de Echinococcus son morfológica y biológicamente uniformes en grandes áreas geográficas, como consecuencia de la

existencia de un flujo genético entre las diferentes poblaciones debido a que es la fecundación cruzada el principal mecanismo de reproducción. En el caso de E. granulosus, son las prácticas ganaderas las que pueden haber alzado barreras ecológicas y/o geográficas entre poblaciones asociadas a distintos hospedadores intermediarios domésticos, sometiendo dichas poblaciones a diferentes presiones de selección. Debido a que en cada población la variación genética es grande, gracias a la fecundación cruzada, éstas pueden responder rápidamente a la selección, divergiendo genéticamente y siendo reconocidas como cepas diferentes. Los datos obtenidos por Lymbery & Thompson (1988), que reflejan variación genética intracepa, y los de Lymbery *et al.* (1989), que observan una distribución en grupos de los adultos en el intestino del hospedador definitivo, apoyarían este modelo.

Si el mecanismo de reproducción es exclusivamente por autofecundación (modelo de Smyth), puede producirse un proceso de especiación tanto simpátrico como alopátrico, pues los distintos individuos estarían reproductivamente separados entre ellos, estén también geográficamente separados o no. Si el mecanismo reproductor es normalmente por fecundación cruzada (modelo de Rausch), el proceso de especiación normalmente aceptado es el alopátrico (Mayr, 1963), aunque algunos autores consideran que la especiación simpátrica sería común en organismos parásitos, ya que al localizarse en hospedadores diferentes estarían aislados ecológica, aunque no geográficamente (Bush, 1975; White, 1978; Price, 1980). Hay, sin embargo, objetores a este proceso simpátrico (Futuyma & Mayer, 1980; Paterson, 1981), que se podría producir, en el caso de Echinococcus, si las relaciones predador-presa fuesen muy estrictas. Al no ser éste el caso (Rausch, 1986), sería el proceso alopátrico el predominante en la evolución del género.

El origen de la discrepancia entre ambos modelos es el tipo de fecundación (cruzada o autofecundación). Las observaciones hasta el momento realizadas han sido, todas ellas, de autofecundación (Smyth & Smyth, 1969; Smyth,

1982; Kumaratilake *et al.*, 1986), pero esto puede ser debido a problemas de tipo técnico en la obtención de preparaciones de vermes tan pequeños en cópula (Kumaratilake *et al.*, 1986). Lymbery *et al.* (1989) encontraron un modelo agregativo en la dispersión de los adultos en el intestino del perro (típicamente, 4-5 individuos en áreas de 12 mm²), explicando este hecho, entre otras posibilidades, como un comportamiento de potenciación de la fecundación cruzada. Según Rausch (1985), la autofecundación se produciría más como consecuencia de una situación de stress que como proceso natural de reproducción, por lo que las observaciones hasta el momento realizadas, en animales sacados del hospedador, tienen poco valor para interpretar su comportamiento reproductor.

No obstante, los dos modelos de reproducción (cruzada y autofecundación) no tiene por qué excluirse mutuamente. Es evidente, por otro lado, que la no existencia de fecundación cruzada sería una desventaja adaptativa o evolutiva para cualquier ser vivo, a no ser que el individuo presentase, en su lugar, un alto grado de mutabilidad unido a un ciclo reproductivo corto. Dado que, por consiguiente, es de suponer que en los adultos de Echinococcus se presentan ambos tipos de fecundación, ambos modelos de especiación (Smyth y Rausch) podrían ser ciertos para este cestodo.

2.2.3. CRITERIOS DE IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE CEPAS

En la Tabla 2 se recogen los criterios que han sido empleados en la caracterización de cepas en Echinococcus. Aunque, siguiendo el concepto de cepa de Thompson & Lymbery (1988), éstas deberían diferenciarse por características ecológicas, fisiológicas o de comportamiento, con importancia en la epidemiología y control de la parasitosis, dichos caracteres no suelen poderse relacionar directamente con el genoma; por ello, algunos autores se refieren a

estos caracteres como extrínsecos (Lumsden, 1974; Chance, 1979). Con frecuencia son un excelente indicador de variación, pero tienen que ser corroborados por otros caracteres que reflejen de una forma más directa las diferencias genómicas. Éstos son denominados caracteres intrínsecos. De ellos, sólo los estudios sobre el ADN proporcionan una medida directa de las diferencias genotípicas. Los demás caracteres, al igual que los criterios extrínsecos, pueden verse afectados tanto por el genotipo como por el ambiente; en este sentido, hay trabajos en los que se consideran las diferencias observadas en caracteres morfológicos, bioquímicos e inmunológicos, larvarios y del adulto, en relación con la especie de hospedador, la edad, el grado de desarrollo o la localización del parásito (Lubinsky, 1962; Sweatman & Williams, 1963; Sánchez & Sánchez, 1971; Pauluzzi *et al.*, 1972; Ibragimov, 1974; Schantz *et al.*, 1976; Anguiano,

Tabla 2 - Criterios empleados en la diferenciación y caracterización de cepas en Echinococcus.

Criterios ecológicos y epidemiológicos
Distribución geográfica
Especificidad por el hospedador intermediario/final
Comportamiento y fisiología
Desarrollo <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i>
Período de prepatencia
Morfología
Morfología y morfometría del roseto larvario y del adulto
Forma, tamaño y disposición de órganos sexuales en el adulto
Morfología del metacestodo
Bioquímica
Metabolismo
Análisis de proteínas
Análisis de isoenzimas
Inmunología
Respuesta inmunológica
Caracterización antigénica
Análisis de ADN
Composición de bases
Estudios con enzimas de restricción
Hibridación
RAPD

1984; Chowdhury *et al.*, 1986; Hurd, 1989; Rodríguez-Caabeiro *et al.*, 1989; Hobbs *et al.*, 1990; Anwar *et al.*, 1993). Dichas diferencias, a nivel morfológico, podrían ser más un reflejo de adaptaciones fenotípicas a ambientes estructural o fisiológicamente algo diferentes, que debidas a diferencias genéticas (Thompson, 1982); a nivel bioquímico, podrían ser debidas a cambios inducidos por el hospedador sobre la expresión de proteínas estructurales, quizá como consecuencia de una cierta flexibilidad bioquímica (Hobbs *et al.*, 1990). Un cambio en las condiciones ambientales de una especie de hospedador a otra podría imponer restricciones al metabolismo del parásito, llevando a vías bioquímicas diferentes; esta flexibilidad metabólica ha sido propuesta en helmintos por Bryant & Flockhart (1986).

En cualquier caso, los criterios inmunológicos, bioquímicos y de análisis de ADN son menos susceptibles a la influencia de factores ambientales que la morfología, por lo que son, en principio, más adecuados para determinar diferencias genéticas entre cepas. Sin embargo, estos criterios no tienen, por el momento, una gran aceptación en taxonomía, aunque se han mostrado válidos como indicadores epidemiológicos de variación en todos los grupos de parásitos (Peters, 1981; Thompson, 1982; Godfrey, 1984; Gibson & Miles, 1985; Rollinson *et al.*, 1986; Simpson, 1986). Hay que hacer notar, no obstante, que estos criterios pueden emplearse para identificar poblaciones genéticamente independientes si se aplican a muestras de un tamaño adecuado, y que pueden indicar que dichas poblaciones siguen rutas evolutivas diferentes, pero, y de acuerdo con el concepto de cepa aceptado por nosotros, no deberían ser la base del reconocimiento de cepas diferentes en tanto no se compruebe que dichas cepas también difieran en caracteres de significación práctica.

2.2.3.1. Criterios ecológicos y epidemiológicos

2.2.3.1.1. Distribución geográfica

La aplicación de un criterio de segregación geográfica sin considerar los diferentes aspectos de la especiación en Echinococcus ha permitido el reconocimiento de subespecies taxonómicamente válidas, lo cual no implica, como ya se ha mencionado en apartados anteriores, que sean realmente cepas distintas (Thompson, 1995). Por otro lado, poblaciones diferentes del parásito, con características biológicas y morfológicas propias, pueden haber perdido su validez taxonómica debido a su ocurrencia simpátrica.

Existe la evidencia de que los ciclos ovino y equino se mantienen independientes en condiciones naturales en el Reino Unido, donde la hidatidosis equina es general y la ovina se localiza en ciertas áreas geográficas, situación que también ocurre en Irlanda (Cook, 1965). Del mismo modo, se ha observado la diferente localización geográfica del ciclo perro/cerdo con respecto al ciclo perro/oveja en algunos países (Rusia, la antigua Yugoslavia, Hungría y Polonia) (Kuznetsov *et al.*, 1980).

En Australia, la separación geográfica se considera como uno de los factores más importantes en la "segregación" de cepas, ya que las áreas endémicas de hidatidosis están separadas entre sí por grandes zonas desérticas o por masas de agua (Thompson & Kumaratilake, 1982).

2.2.3.1.2. Especificidad de hospedador

Aunque en algunos casos pueda ser clara la preferencia de hospedador intermediario y/o final de algunas cepas o variantes en diversos países, en la

mayoría de los casos la división real entre poblaciones o entre sus ciclos es difícil de asegurar, siendo algunas cepas de carácter multihospitalario.

Hospedador definitivo

Williams & Sweatman (1963) señalaron que uno de los criterios que distinguen las cepas ovina y equina en el Reino Unido es la capacidad de esta última para infestar a zorros y perros, mientras que la cepa ovina sólo es capaz de desarrollarse en perros. Estos resultados, confirmados por Hawkins *et al.* (1965), Cook (1989) (infestación experimental de zorros con protoescólices de quistes equinos) y Clarkson & Walters (1991) (pobre infestación de zorros con protoescólices de quistes ovinos británicos), se contradicen con los obtenidos por Thompson & Smyth (1975) (zonas de baja prevalencia en zorros que coinciden con aquellas en donde no existe el ciclo perro/oveja) y Thompson (1983) (desarrollo de vermes adultos en zorros infestados con protoescólices de quistes ovinos australianos).

En Suiza, en la que existe una cepa bovina con características distintivas respecto a otras cepas, el único hospedador definitivo es el perro (Eckert & Thompson, 1988). En Polonia, en donde se ha detectado una cepa suina, el hospedador definitivo es también el perro, aunque experimentalmente se han obtenido vermes adultos de esta cepa en zorros (Malczewski, 1963). En el norte de África existe una cepa de camellos, la cual parece mantenerse fundamentalmente en perros, si bien se ha encontrado ocasionalmente en chacales (Euzèby, 1991).

En Australia existe una cepa silvestre que parece emplear preferentemente como hospedador definitivo a los dingos (Thompson & Kumaratilake, 1985). En África, la forma selvática parece usar como único hospedador definitivo al león (Graber & Thal, 1980). En Asia, la cepa silvestre parece mantenerse empleando chacales (Canis aureus) como hospedador definitivo; la cepa de

búfalo (quizá búfalo-vaca) puede desarrollarse en zorros (Rao, 1968). En Suramérica, Schantz *et al.* (1975) consideraron la no existencia de cepas silvestres, ya que tanto perros como zorros se pudieron infestar a partir de quistes ovinos.

Hospedador intermediario

La susceptibilidad de una especie animal a la parasitación por el meta-cestodo se ha pretendido evaluar mediante la capacidad de desarrollo de quistes en dicha especie, el tamaño y desarrollo de los quistes formados, y la viabilidad y fertilidad de los mismos. Estos datos han sido complementados con los obtenidos de experimentos de infestaciones cruzadas entre distintas especies de hospedadores intermediarios naturales, a partir de muestras de origen conocido, que aunque pueden no reflejar exactamente la situación de los ciclos epidemiológicos en poblaciones parásitas naturales, pueden servir de apoyo a supuestos de naturaleza epidemiológica. En este tipo de pruebas, los datos considerados han sido la posibilidad o no de desarrollo de la forma larvaria en distintas especies de hospedador, su tamaño, fertilidad, tiempo de desarrollo y respuesta provocada.

Simonsen *et al.* (1979) no consiguieron el desarrollo de quistes al infestar ovejas con huevos procedentes del ciclo perro/reno (biotipo norteño). Rausch (1986, 1995) considera al biotipo norteño como aparentemente no infestante para cerdos, ovejas, vacas y distintos roedores, y sí para el hombre, aunque de forma poco patógena. La infestación de corzos con material de origen ovino, pero no de origen equino, fue obtenida por Williams & Sweatman (1963), demostrándose así la posible conexión entre los ciclos silvestre y doméstico.

En base a los resultados obtenidos en hospedadores naturales y en infestaciones cruzadas, en Europa (en donde se han hecho numerosos estudios) podrían existir cuatro cepas: ovina-bovina¹, equina (Williams & Sweatman, 1963;

Hatch & Smyth, 1975; Thompson & Smyth, 1975; Thompson *et al.*, 1984), bovina² (Thompson *et al.*, 1984), y suina (Kuznetsov *et al.*, 1975, 1980; Stojmenov & Kaloyanov, 1980; Wikerhauser *et al.*, 1986a, b; Worbes, 1986; Eckert *et al.*, 1993). Hay que hacer mención de los datos aportados por Cook (1989), quien, en varios experimentos de transmisión cruzada, concluye que sólo existe una forma de E. granulosus en el Reino Unido (E. g. equinus), capaz de infestar a ovejas y caballos. Este resultado, que se contrapone a las diferencias fenotípicas y genotípicas encontradas por otros autores mediante la aplicación de distintas técnicas, ha sido contestado por Lymbery & Thompson (1989a).

En varios países de Asia se han citado hasta un total de cuatro posibles cepas: ovina, de búfalos (Gill & Rao, 1967), caprina (Pandey, 1972), y silvestre (Paramananthan & Dissanaiké, 1961; Dissanaiké, 1962).

En Africa se han encontrado zonas de alta prevalencia y fertilidad en humanos (Macpherson, 1983), quizá debidas a la existencia de una cepa local. Se han citado, además, las cepas ovina, bovina (similar a la bovina² europea, en Suráfrica) (Verster, 1962; Thompson *et al.*, 1984), de camellos (Dada *et al.*, 1981; Macchioli *et al.*, 1987), y silvestre (Graber & Thal, 1980).

En Australia, Thompson & Kumaratilake (1982) han identificado una cepa silvestre, que afecta a macrópodos, coexistiendo con la cepa ovina.

2.2.3.2. Comportamiento y fisiología

2.2.3.2.1. Desarrollo *in vitro*

Cultivos en dirección vesicular

Hasta el momento, sólo se han encontrado ligeras diferencias entre las muestras ovinas y equinas europeas. En ambos casos se pueden formar

microquistes a partir de protoescólices vacuolizados; en el caso de las muestras ovinas, además, también sería posible dicha formación (teniendo en cuenta los resultados de Smyth, 1962b, 1967) a partir de exovesículas desarrolladas en posición posterior; con las muestras equinas, sin embargo, Rogan & Richards (1986) consideran que los microquistes se forman a partir de dichas exovesículas sólo si se liberan del protoescólex, no si permanecen unidas a él. Esta liberación de las exovesículas no ha sido observada en los cultivos de muestras de origen ovino (Casado Escribano, 1987).

Cultivos en dirección estrobilar

Una vez puesta a punto la técnica para conseguir el desarrollo completo del verme adulto en cultivos *in vitro*, a mediados de los años '60 (Smyth *et al.*, 1966) se encontraron claras diferencias en el desarrollo final alcanzado, según el origen de la muestra. Así, mientras que las muestras de origen ovino llegan a la formación de varios segmentos y gónadas, las muestras de origen equino no llegan siquiera a segmentar (Smyth & Davies, 1974a; Smyth, 1979a,b, 1982b; Kumaratilake *et al.*, 1983; Howell, 1986; Richards & Rogan, 1986); sin embargo, Hijjawi *et al.* (1992b), aunque han encontrado las mismas diferencias mencionadas, en cultivos prolongados (81-114 días) observaron que algunos individuos de origen equino llegaron al estadio de bandeo y segmentación, alcanzando un tamaño máximo de 1,6 mm (frente a los 2,9 mm observados en sus cultivos de protoescólices de origen ovino), pero sin llegar a formar ningún esbozo de las gónadas.

A la vista de estos resultados, se pensó entonces en la utilidad que este tipo de pruebas podría tener como herramienta taxonómica de discriminación entre variantes del parásito (Smyth & Davies, 1979). Empleando material parasitario procedente de otros hospedadores se han conseguido resultados intermedios entre los anteriores.

Smyth (1979b) realizó los primeros intentos de cultivar *in vitro* protoescólices de E. granulosus de origen bovino (de Irlanda), observando que no crecían (aunque sobrevivieron durante 35 días), y concluyendo que fallan en el desarrollo de la misma forma que los protoescólices de origen equino. Sin embargo, estos datos se oponen a los obtenidos posteriormente por Macpherson & Smyth (1985) con muestras de bovinos de Kenia; en este trabajo, se considera el resultado negativo obtenido por Smyth con las muestras bovinas irlandesas como dudoso, haciéndose necesaria la confirmación del mismo por estudios posteriores. Los datos obtenidos por Macpherson & Smyth (1985), con muestras ovinas, bovinas, caprinas, humanas, camelinas (todas ellas de Kenia) y de búfalo (de la India), observando la formación de uno o varios segmentos en todos los casos, con unos tiempos de desarrollo similares para las distintas muestras keniatas, permitieron a estos autores considerar las distintas poblaciones simpátricas del parásito como posiblemente idénticas (cepa ovina) e infectivas para todas las especies de hospedador intermediario presentes en Kenia.

Con muestras humanas, Smyth *et al.* (1980) fueron los primeros investigadores en realizar cultivos en dirección estrobilar. Observaron la segmentación de los protoescólices después de 28 días de cultivo, llegando a diferenciarse los órganos sexuales y a formarse dos segmentos. Para estos autores, el quiste analizado pertenecía a la cepa ovina (resultado similar al antes indicado por Macpherson & Smyth, 1985). Smyth & Barrett (1980) consideraron esta técnica como uno de los criterios a emplear para determinar la viabilidad y el posible origen del material parasitario que provoca la infestación en humanos.

El cultivo de vermes inicialmente desarrollados *in vivo* ha sido también empleado para la caracterización de cepas procedentes de distintos hospedadores intermediarios, o de los mismos si éstos procedían de distintas zonas geográficas. Así, Thompson (1977) señala que la formación de huevos, posible mediante esta técnica mixta *in vivo-in vitro*, se inicia antes en el caso de los protoescólices de origen ovino que en los de origen equino; y Kumaratilake *et*

al. (1983) observaron diferencias de hasta 7 días en los tiempos de formación de huevos entre muestras ovinas de Tasmania y de Australia continental, apoyando los resultados obtenidos por otras técnicas que consideran dichas muestras como pertenecientes a cepas diferentes del parásito.

2.2.3.2.2. Desarrollo *in vivo*

Metacestodo - hospedadores naturales

En estudios realizados sobre los hospedadores intermediarios naturales se ha tenido en cuenta la localización del quiste, su aspecto, tamaño y grado de fertilidad.

La localización pulmonar es la preferente en las muestras de camellos (Dada *et al.*, 1980; Saad, 1982) y en las bovinas (Eckert & Thompson, 1988). En el caso de la cepa bovina suiza, los quistes, de pequeño tamaño, se localizan en la zona interna de los pulmones, en donde es difícil su detección (Eckert, 1981, citado por Thompson & Lymbery, 1988). Sin embargo, para las muestras equinas la localización principal es la hepática (Thompson, 1986). En el caso de las muestras ovinas, ambos órganos son los principalmente parasitados, si acaso algo más frecuentemente el hígado. En el hombre la localización más común es también el hígado (Thompson, 1986).

En cuanto al grado de fertilidad quística, diversos autores dan diferentes valores para las muestras de origen ovino, desde el 30% hasta el 100% (Bortolletti & Ferretti, 1978; Himonas *et al.*, 1987; Singh & Dhar, 1988b; entre otros). En Nueva Zelanda se ha calculado que el 99% de los quistes ovinos serían fértiles si los animales llegaran a vivir 17 años (Gemmell & Lawson, 1986). Los quistes bovinos suelen ser estériles, salvo en las zonas en las que predomina el ciclo perro/vaca, como Suiza o Alemania, en donde el grado de fertilidad

aumenta a la vez que el de los quistes ovinos disminuye (Hörchner *et al.*, 1986; Eckert & Thompson, 1988; Hahn *et al.*, 1988; Worbes *et al.*, 1989). En América, González *et al.* (1981), estudiando la fertilidad de los quistes en Chile, encuentran diferencias entre las muestras de origen ovino, bovino y suino. En la India se han encontrado valores elevados de fertilidad en los quistes de búfalos (incluso superiores al 90%), y bajos en los ovinos (Irshadullah *et al.*, 1989).

Metacestodo - hospedadores experimentales

Las diferencias observadas en el modelo de H.S.E. entre muestras procedentes de diferentes especies de hospedador intermediario hacen referencia, principalmente, a la capacidad o no de desarrollo en el modelo experimental murino y a los tiempos necesarios para alcanzar los distintos estadios evolutivos (básicamente, aparición de quistes fértiles), y, en menor medida, a la localización de los quistes formados.

Las muestras de origen ovino se desarrollan bien en el modelo murino de H.S.E.; en el caso de las muestras equinas, sin embargo, los datos son contradictorios: de Waele & de Cooman (1938), Pennoit-de Cooman & de Rycke (1970), de Rycke & Pennoit-de Cooman (1978), Connor (1980), Marshall & Edwards (1982) y Janssen *et al.* (1992) obtuvieron buenas infestaciones experimentales, mientras que Thompson (1976b) observó un escaso o nulo desarrollo quístico, aconsejando el empleo de jerbillos en vez de ratones como hospedadores experimentales de las muestras equinas. Estos mismos animales también son un buen hospedador experimental de las muestras ovinas (Schwabe *et al.*, 1964, 1970; Varela-Díaz *et al.*, 1974; Kammerer & Pérez-Esandi, 1975). En España, De Domingo Gadea & Cuesta Bandera (1987) observaron también diferencias entre las muestras ovinas y equinas, presentando estas últimas un peor desarrollo en ratones (fundamentalmente, una mayor mortandad en las fases iniciales de la infestación).

Respecto al tiempo necesario para el desarrollo de quistes fértiles, éste ha sido similar para las distintas muestras analizadas, variando entre 7-8 meses (Heath, 1970) a 15 meses (Kumaratilake & Thompson, 1983; Cuesta Bandera & Martínez Fernández, 1984b; Yastreba & Skvortsova, 1991) para las muestras de origen ovino, y de 7 (Connor, 1980) a 12-15 meses (Pennoit-de Cooman & de Rycke, 1970; Janssen *et al.*, 1992) para las de origen equino (resultados similares se han obtenido, con las muestras equinas, empleando gerbillos - Thompson, 1976a, b-). Kumaratilake & Thompson (1983) observaron diferencias entre muestras ovinas de Australia continental y de Tasmania, en el número de quistes fértiles formados y en el tiempo necesario para ello.

Con muestras rusas, Bessonov & Yastreba (1991) diferenciaron las de origen suino (cuya capacidad de infestación y grado de desarrollo fue menor, no llegando éste a completarse), las de camello (las más rápidas en desarrollar quistes fértiles -6 meses-, aunque en menor cantidad, limitándose la infestación a la cavidad intestinal) y las de ovino-bovino (más lentas en su desarrollo -15 y 12 meses, respectivamente-, pero con un mayor porcentaje de animales con quistes fértiles). Estos datos concuerdan con los obtenidos con muestras suinas, ovinas y bovinas de la misma zona por Yastreba (1986) y Yastreba & Skvortsova (1991).

Adulto

No son muchas las experiencias realizadas *in vivo* con los adultos, debido al riesgo que conlleva su manipulación. En los estudios realizados se ha tenido en cuenta el período de prepatencia, el número de individuos asentados en el intestino del hospedador definitivo, su localización y grado de desarrollo. Como hospedador se han utilizado perros, en ocasiones conjuntamente con dingos o con zorros.

Las implicaciones que sobre la epidemiología y la estructuración de los programas de control tienen las diferencias en los períodos de prepatencia de las distintas variantes de Echinococcus granulosus se relacionan con el establecimiento de la periodicidad del tratamiento antihelmíntico en perros. Es de vital importancia, por tanto, tener en cuenta esta característica diferencial, observada por numerosos autores, para que las medidas de prevención y control de la hidatidosis sean realmente efectivas, en relación con la quimioprofilaxis canina.

El primer trabajo que hace referencia a las diferencias en los períodos de prepatencia es de Williams & Sweatman (1963), con 40 días para la cepa ovina y 70 o más para la equina. Estos datos son confirmados por Thompson (1977), que señala ciertas diferencias entre las cepas ovina y equina británicas, desarrollándose la primera algo más rápido que la segunda. En Suiza, Thompson *et al.* (1984) observaron un desarrollo muy rápido de la cepa bovina allí presente, formándose anillos grávidos en 35 días (frente a los 40-45 días de las muestras ovinas). En Polonia, Lübke (1973) observa un desarrollo más lento de la cepa suina (59-105 días), datos que contrastan con los obtenidos por Eckert *et al.* (1993), que obtienen un rápido desarrollo en perros; sin embargo, en ambos casos se diferencian las muestras suinas de las de otros hospedadores intermediarios. Kumaratilake *et al.* (1983) y Thompson & Kumaratilake (1985), en Australia, encontraron diferencias en la velocidad de desarrollo entre las distintas cepas allí presentes (ovina continental, ovina de Tasmania, de macrópodos); además, en el caso de la cepa de macrópodos, el desarrollo fue más lento en perros que en dingos.

2.2.3.3. Morfología

Las características analizadas por diversos autores han sido el tamaño, número, forma y posición de los ganchos en protoescólices y adultos, longitud

total del adulto, longitud del último segmento, número total de anillos, posición del anillo maduro, posición del poro genital, número y distribución de testículos, forma y tamaño del saco del cirro, y forma del ovario. También se ha valorado el tamaño de los quistes y el espesor de las membranas germinativa y laminar, así como su ultraestructura.

La mayor parte de los estudios realizados sobre Echinococcus se han realizado con material de origen europeo o australiano, siendo las muestras más estudiadas a todos los niveles, incluido el morfológico, las ovinas y equinas. Williams & Sweatman (1963) fueron los primeros en describir en detalle las características morfológicas de los adultos y los protoescólices de quistes equinos de procedencia británica, atribuyendo el rango de subespecie (posteriormente invalidado) a dichas muestras. Estos autores encontraron como características diferenciales respecto a las muestras ovinas, la disposición del saco del cirro y de los testículos, y la estructura y tamaño de los ganchos tanto larvarios como adultos (Tabla 3, Figura 6).

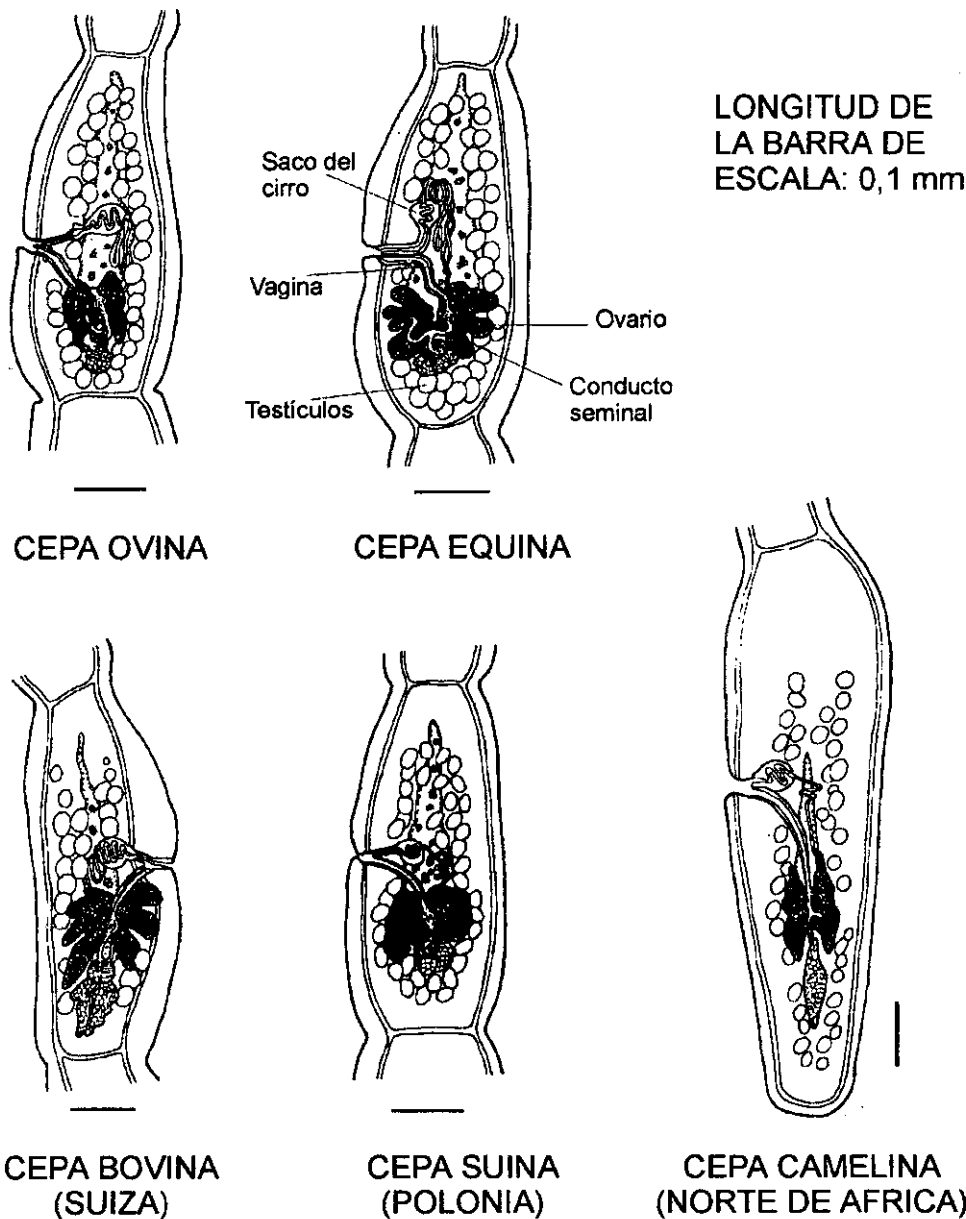
Tomando los datos de Williams & Sweatman (1963) como referencia, Dailey & Sweatman (1965), en Líbano y Siria; Macchioni & Gallo (1967), en Italia; Hatch (1970) en Irlanda; Thompson & Smyth (1975) en Gran Bretaña; y Bowie *et al.* (1984), en Nueva Zelanda, confirmaron la existencia de la cepa equina en diferentes partes del mundo. Kumaratilake *et al.* (1986a) realizaron un estudio detallado de las muestras equinas procedentes de diferentes países, con el doble objetivo de determinar la distribución de esta cepa, y de caracterizar de una forma más precisa su morfología, tanto del adulto como del protoescólex. Analizaron las características morfométricas de los ganchos larvarios y del adulto, y las características del aparato reproductor. Los datos obtenidos reflejaron una considerable uniformidad de las muestras equinas, pudiéndose emplear, como caracteres diferenciales, las dimensiones de los ganchos tanto larvarios como del adulto, la forma del ovario y del saco del cirro, y la distribución de los testículos (Tabla 3, Figura 6).

Tabla 3 - Características morfológicas diferenciales entre cepas de *E. granulosus* (de Europa y Norte de África).

Cepa	Caracteres diferenciales	Referencias
OVINA	<p>Saco del cirro piriforme, horizontal o ligeramente doblado hacia delante.</p> <p>Testículos (28-50) dispuestos por todo el anillo, con 0-1 filas posteriores a la glándula vitelina.</p> <p>Porro genital posterior al punto medio del anillo.</p> <p>Ovario compacto, con lóbulos poco marcados.</p> <p>Tamaño de los ganchos:</p> <p>larvarios: 24,6-25,9 μm (grandes) 21,4-22,6 μm (pequeños) (rango: 22-29 μm) (rango: 17-27 μm)</p> <p>adulto: 29,5-35,7 μm (grandes) 23,9-27,5 μm (pequeños) (rango: 25-40 μm) (rango: 16-35 μm)</p>	<p>Williams & Sweatman, 1963</p> <p>Thompson <i>et al.</i>, 1984</p> <p>Kumaratilake <i>et al.</i>, 1986a</p>
EQUINA	<p>Saco del cirro redondeado, claramente doblado hacia delante.</p> <p>Testículos (30-50) por todo el anillo, con 1-3 filas posteriores a la glándula vitelina.</p> <p>Porro genital en posición central o posterior al punto medio del anillo.</p> <p>Ovario alargado y con lóbulos marcados.</p> <p>Tamaño de los ganchos:</p> <p>larvarios: 29,4-31,1 μm (grandes) 25,6-28,2 μm (pequeños) (rango: 26-33 μm) (rango: 21-31 μm)</p> <p>adulto: 38,5-44,5 μm (grandes) 31,5-34,7 μm (pequeños) (rango: 30-52 μm) (rango: 22-44 μm)</p>	<p>Williams & Sweatman, 1963</p> <p>Kumaratilake <i>et al.</i>, 1986a</p>
SUINA (Polonia)	<p>Saco del cirro esférico a piriforme, horizontal o ligeramente doblado hacia delante.</p> <p>Testículos (50-60) distribuidos por todo el anillo, con 1-2 filas posteriores a la glándula vitelina.</p> <p>Porro genital central o posterior al punto medio del anillo.</p> <p>Ovario compacto, con lóbulos poco marcados o ausentes.</p> <p>Tamaño de los ganchos:</p> <p>larvarios: 29,1 μm (grandes) 24,4 μm (pequeños) (rango: 26-31 μm) (rango: 21-27 μm)</p> <p>adulto: 35,4 μm (grandes) 28,4 μm (pequeños) (rango: 31-39 μm) (rango: 24-32 μm)</p>	<p>Eckert <i>et al.</i>, 1993</p>
BOVINA (Suiza, Alemania)	<p>Saco del cirro esférico a piriforme, horizontal o ligeramente doblado hacia delante.</p> <p>Testículos (20-40) en la zona central del anillo, no dispuestos en filas posteriores a la glándula vitelina.</p> <p>Porro genital anterior al punto medio del anillo.</p> <p>Ovario alargado, con lóbulos marcados.</p> <p>Tamaño de los ganchos:</p> <p>larvarios: 28,9 μm (grandes) 24,8 μm (pequeños) (rango: 26-32 μm) (rango: 22-29 μm)</p> <p>adulto: 39,1 μm (grandes) 32,7 μm (pequeños) (rango: 37-41 μm) (rango: 31-34 μm)</p>	<p>Thompson <i>et al.</i>, 1984</p> <p>Eckert <i>et al.</i>, 1989</p> <p>Worbes <i>et al.</i>, 1989</p>
CAMELINA (Norte de África)	<p>Saco del cirro esférico a piriforme, horizontal o ligeramente doblado hacia delante.</p> <p>Testículos (38-50) distribuidos por todo el anillo, con 1 fila posterior a la glándula vitelina.</p> <p>Porro genital anterior al punto medio del anillo.</p> <p>Ovario alargado, con lóbulos poco marcados o ausentes.</p> <p>Tamaño de los ganchos:</p> <p>larvarios: 30,9 μm (grandes) 24,8 μm (pequeños) (rango: 28-33 μm) (rango: 20-28 μm)</p> <p>adulto: 35,4 μm (grandes) 28,8 μm (pequeños) (rango: 30-39 μm) (rango: 25-32 μm)</p>	<p>Eckert <i>et al.</i>, 1989</p>

Figura 6 - Características morfológicas de los órganos reproductores de varias cepas de *E. granulosus* (Europa y Norte de África) (según Thompson *et al.*, 1984; Kumaratilake *et al.*, 1986a; Eckert *et al.*, 1993).

Se indican sólo los caracteres más importantes para diferenciar cepas. Para identificar todas las estructuras, ver la Figura 1.



En Europa, a partir de datos epidemiológicos referentes a Suiza, que reflejaban una fertilidad muy elevada de los quistes de bovinos, Thompson *et al.* (1984) realizaron un estudio detallado de dichas muestras, comparándolas con muestras ovinas y bovinas inglesas y australianas, a nivel morfológico (del adulto y de los protoescólices) y biológico (desarrollo en perros). Encontraron una serie de características diferenciales, que, a nivel morfológico, se refieren al mayor tamaño de los ganchos (tanto del protoescólex como del adulto), a la mayor longitud del adulto, y a las características anatómicas de los órganos reproductores (Tabla 3, Figura 6). Esta cepa fue posteriormente identificada en Alemania por Worbes *et al.* (1989).

En Ucrania, Skvortsova & Artemenko (1987) observaron diferencias en el número y longitud de los ganchos de protoescólices de origen ovino, bovino y suino, así como en el tamaño de los protoescólices. Estos datos apoyan los recogidos por Kuznetsov *et al.* (1980), quienes también observan diferencias (morfológicas, antigénicas y epizootiológicas) entre muestras ovinas y suinas rusas.

Eckert & Thompson (1988) revisaron, a nivel de cepas identificadas y de las técnicas empleadas para ello, la situación existente en Europa. Empleando la morfología (principalmente, el tamaño de los ganchos y las características de los órganos sexuales del adulto), diferenciaron las cepas ovina, equina, bovina (suiza) y suina (Este de Europa). En 1991, Euzèby realizó una nueva revisión, centrándose en la cuenca mediterránea, y citando las diferentes cepas identificadas.

Recientemente, Eckert *et al.* (1993) realizaron un estudio morfológico, de desarrollo y genético de muestras suinas de Polonia. Encontraron, a nivel morfológico, algunas similitudes con muestras procedentes de otras especies de hospedador (principalmente, con muestras de camello), pero diferenciándose de las muestras ovinas, bovinas suizas y equinas (con las que puede compartir

ámbito geográfico) en lo referente a las medidas de los ganchos larvarios y del adulto, y en varios aspectos de la anatomía de los órganos reproductores (Tabla 3, Figura 6). Dado que estas diferencias fueron también observadas a nivel genético, estos autores consideran las muestras suinas europeas como pertenecientes a otra cepa diferente.

En África la situación es más compleja. En el sur del continente africano, las diferencias morfológicas encontradas entre muestras de diferentes hospedadores fueron utilizadas por Verster (1965) para describir cinco subespecies. Posteriormente invalidadas, algunas de dichas subespecies podrían corresponder a cepas domésticas o silvestres; así, podrían identificarse entre dichas subespecies, una cepa ovina y una cepa silvestre (Kumaratilake & Thompson, 1982a), y una cepa bovina de características similares a la cepa bovina suiza (Thompson *et al.*, 1984).

En Asia, Gil & Rao (1967), analizó muestras de búfalo, y Pandey (1972), muestras caprinas. En ninguno de ambos casos las muestras analizadas fueron consideradas por los respectivos autores como coincidentes con alguna de las subespecies descritas hasta ese momento, por lo que fueron propuestas como nuevas variantes del parásito.

En un estudio realizado en Jordania sobre muestras de varios hospedadores intermediarios diferentes (incluido el hombre), Said *et al.* (1988) diferenciaron tres grupos, en base a las longitudes de los ganchos de los protoescólices, aunque sin establecerlos categóricamente como cepas: el grupo de las muestras equinas, claramente diferente por su mayor tamaño; el grupo ovino-caprino-bovino, cuyas muestras no eran estadísticamente diferentes en 6 de las 9 características analizadas por estos autores; y el grupo de las muestras de camello y humanas, no estadísticamente diferentes en 7 de las características consideradas. Hay que señalar que estos autores consideraron dos de las variables (las referentes a la longitud de la hoja de los ganchos grandes y

pequeños) de forma distinta a como se hizo en trabajos previos, obteniendo unos valores superiores, no comparables a los publicados para muestras similares.

Al año siguiente, Eckert *et al.* (1989) realizaron un estudio morfológico y biológico (de desarrollo *in vivo* en perros) sobre muestras de camellos procedentes, posiblemente, de Oriente Medio. En base a las diferencias observadas en el adulto (número de anillos, posición del anillo maduro, posición del poro genital, anatomía del aparato reproductor femenino), consideran que se trata de una cepa diferente (Tabla 3, Figura 6). A nivel de morfología y tamaño de los ganchos (tanto larvarios como del adulto), las diferencias son patentes respecto a las muestras de origen ovino, pero son menos marcadas, incluso inexistentes, respecto a las muestras equinas y las bovinas suizas.

En América, los trabajos publicados han hecho referencia a la descripción de nuevas subespecies, no a la identificación de cepas del parásito. Sweatman & Williams (1963) diferenciaron, en Canadá, dos subespecies, afectando ambas a animales salvajes (posiblemente se tratara de la *forma nortea* del parásito), distintas de la subespecie nominal, presente en animales domésticos (ovinos de Nueva Zelanda). Los caracteres morfológicos diferenciales hacían referencia tanto a las características de los ganchos larvarios y del adulto, como a las características del estróbilo de éstos. En Suramérica, Blood & Lelijveld (1969) identificaron una subespecie afectando a animales silvestres, en base, entre otros características, a la morfología del estróbilo; sin embargo, Schantz *et al.* (1975) no observaron tales diferencias, por lo que, junto con otros criterios, invalidaron dicha subespecie.

El primer trabajo sobre las características morfológicas de las cepas australianas fue realizado por Kumaratilake & Thompson (1984a). Estos autores caracterizaron a nivel morfológico las 3 cepas previamente identificadas en Australia mediante técnicas bioquímicas y estudios de desarrollo. La cepa

silvestre (que afecta a macrópodos) se pudo diferenciar, respecto a las muestras ovinas de la misma zona geográfica (Australia continental), por su mayor número de ganchos (de dimensiones, además, algo menores) (tanto en el protoescólex como en el adulto), por el menor tamaño del adulto, la posición del poro genital, el número de testículos y la morfología del aparato reproductor femenino. Las muestras ovinas de Tasmania se mostraron diferentes por las dimensiones de los ganchos del adulto (y, en menor medida, del protoescólex) y por el número de testículos.

Sin embargo, la viabilidad de los análisis morfológicos en la caracterización de las cepas australianas fue discutido por Hobbs *et al.* (1990), quienes encontraron que los protoescólices de quistes ovinos y de macrópodos diferían tanto en el número como en el tamaño de los ganchos (ya observado por Kumaratilake & Thompson, 1984a), pero indicando que dichas diferencias eran debidas a la influencia del hospedador, y que se mantenían en mayor o menor grado en los ganchos del individuo adulto. Además, encontraron diferencias significativas en función de la especie de macrópodo. En consecuencia, estos autores consideraron que este tipo de pruebas no tiene validez para la caracterización de cepas.

Teniendo en cuenta estos datos, y otros relativos a la no existencia de diferencias a nivel genético entre las diferentes cepas australianas identificadas (dos cepas ovinas y una de macrópodos) (Hope *et al.*, 1991), Constantine *et al.* (1993) emplearon el análisis morfológico de los ganchos de adultos obtenidos de hospedadores definitivos australianos infestados naturalmente como marcador epidemiológico, determinando la fuente de infestación (ovejas o macrópodos) mediante la cual dichos hospedadores definitivos (zorros y dingos) adquirieron la parasitosis.

En definitiva, el estudio morfológico del parásito ha permitido diferenciar claramente las muestras ovinas y equinas, sea cual sea su origen geográfico.

Sin embargo, con el resto de las muestras procedentes de otros hospedadores intermediarios, la situación es menos clara. En Europa, se pueden también identificar mediante estudios morfológicos las cepas bovina suiza y la suina. En Africa y Oriente Medio parece ser que existe, además de la cepas ovina y equina, una cepa adaptada a camellos, quizá infestante para el hombre en algunas regiones, y una cepa bovina (en Suráfrica), similar a la bovina suiza. En Asia se han identificado dos posibles cepas: bovina y caprina. Por último, en Australia, en donde se encontraron diferencias morfológicas, biológicas y bioquímicas que permitieron diferenciar una cepa silvestre, dos cepas ovinas y una equina, la posible homogeneidad genética entre las muestras ovinas y de macrópodos, recientemente puesta de manifiesto, implicaría la existencia de sólo dos cepas, la ovina-silvestre y la equina.

2.2.3.4. Bioquímica

2.2.3.4.1. Metabolismo

Los resultados obtenidos en las primeras experiencias de desarrollo estrobilar *in vitro* con muestras ovinas y equinas llevaron a pensar en la existencia de diferencias metabólicas que afectaran al aprovechamiento de las sustancias presentes en los cultivos. McManus & Smyth (1978) encontraron diferencias en la composición de proteínas, lípidos y ARN entre ambas cepas, así como en el metabolismo respiratorio de las mismas, tanto en condiciones de aerobiosis como de anaerobiosis. Posteriormente, Smyth (1979) diferenció las dos cepas por la concentración de los catabolitos formados. Sin embargo, McManus & Smyth (1982) observaron una gran similitud en los procesos metabólicos de ambas cepas, aunque el rendimiento energético de los distintos pasos fue diferente en cada una de ellas.

2.2.3.4.2. Análisis de proteínas

El análisis de la composición proteica de los protoescólices, las membranas quísticas o los líquidos hidatídicos, o de los patrones proteicos correspondientes, ha sido empleado por varios autores como criterio de diferenciación intraespecífica.

El análisis de las proteínas de protoescólices, separadas por electroforesis en geles de poliacrilamida, se ha probado como un buen criterio de diferenciación intraespecífica. Han sido dos las técnicas fundamentalmente empleadas en estos estudios: electroforesis (SDS-PAGE) en geles homogéneos o de diferentes gradientes (la migración de las proteínas se realiza fundamentalmente en base a su tamaño); e isoelectroenfoque (la migración de las proteínas se realiza fundamentalmente en base a su carga eléctrica -punto isoelectrico-).

Empleando la técnica de SDS-PAGE, Zvolinskene & Sruoga (1976), comparando protoescólices y membranas germinativas de quistes ovinos y suinos, encontraron en estos últimos un mayor número de bandas. McManus & Barrett (1985), analizando proteínas extraídas de la superficie de protoescólices ovinos y equinos, no encontraron marcadas diferencias entre ellos, salvo una banda característica de los equinos, con un peso molecular relativo de unos 110 kDa. Sin embargo, Siles Lucas & Cuesta Bandera (1991b), mediante esta técnica, y previa purificación por columna de las muestras, sí pudieron diferenciar los patrones proteicos de muestras ovinas, equinas y suinas.

La utilidad de las electroforesis en SDS-PAGE, para el análisis de proteínas totales de protoescólices, ha sido puesta en duda por Janssen *et al.* (1990) y Siles Lucas (1993), no considerándola apropiada para diferenciar muestras de diferente origen, debido a la complejidad de los patrones polipeptídicos obtenidos. Por el contrario, con líquidos hidatídicos, Gatne *et al.* (1990), comparando quistes bovinos fértiles y no fértiles, de hígado y pulmón, obtuvieron

patrones mucho más sencillos; y Siles Lucas & Cuesta Bandera (1990) y Siles Lucas (1993) (con líquidos de quistes ovinos, bovinos, caprinos, suinos, equinos y humanos) consideraron válida esta técnica, al poder diferenciar las tres cepas previamente identificadas en España mediante análisis genéticos (Cuesta Bandera, 1988; Cuesta Bandera *et al.*, 1988).

El isoelectroenfoco, aunque ha permitido discriminar entre cepas, ha sido empleado durante poco tiempo (finales de los años '70 - mediados de los '80) para la caracterización infraespecífica en Echinococcus. Los primeros investigadores en emplear esta técnica fueron Lee, Thompson & Davies (citados por Smyth, 1977), diferenciando las cepas ovina y equina británicas de E. granulosus, y éste de E. multilocularis. Estos resultados fueron posteriormente corroborados por Kumaratilake & Thompson (1979) y Kumaratilake *et al.* (1979). En Australia, Kumaratilake & Thompson (1984b) diferenciaron las tres cepas (ovina continental, ovina de Tasmania, silvestre), previamente identificadas mediante otros criterios; las muestras humanas analizadas correspondieron al patrón ovino continental. Además, en estos dos últimos trabajos mencionados (Kumaratilake *et al.*, 1979; Kumaratilake & Thompson, 1984b) se emplearon también protoescolices obtenidos de quistes desarrollados experimentalmente en ratones, no encontrándose diferencias debidas al hospedador, ya que el patrón presentado fue igual al de las correspondientes muestras naturales.

2.2.3.4.3. Análisis de isoenzimas

El estudio de los zimodemas de E. granulosus ha sido realizado por diversos autores (Lee, Thompson & Davies, citados por Smyth, 1977; Le Riche & Sewell, 1978; McManus & Smyth, 1979; Macpherson, 1981; Le Riche *et al.*, 1982; Macpherson & McManus, 1982; Harrison *et al.*, 1986; Lymbery & Thompson, 1988, 1989b; Siles, 1993), y ha sido objeto de controversia (McManus, 1990; Lymbery & Thompson, 1991).

La mayoría de estos estudios se han realizado sobre protoescólices, dada la baja actividad enzimática presente en los líquidos hidatídicos (Lymbery & Thompson, 1988; Siles, 1993). El análisis, por isoelectroenfoque, de los perfiles de la glucosa fosfato isomerasa y de la fosfoglucomutasa parece haber sido el más útil, habiéndose encontrado diferencias entre estas enzimas, en muestras ovinas y equinas británicas (Le Riche & Sewell, 1978; McManus & Smyth, 1979); las muestras bovinas mostraron un patrón similar al ovino (Le Riche & Sewell, 1978).

En Kenia, Macpherson (1981) diferencia entre las muestras de camello y las de oveja, vaca y humanos; algunas de las muestras de cabra fueron similares a las de camello, otras a las de los otros hospedadores. Posteriormente, Macpherson & McManus (1982) encontraron grandes similitudes entre los patrones ovinos, bovinos, humanos y caprinos de Kenia, Reino Unido y Argentina, así como que dichos patrones no dependen de la localización quística en el hospedador; éste tampoco parece influir en los patrones isoenzimáticos (McManus & Macpherson, citados por Macpherson & McManus, 1982); sin embargo, Harrison *et al.* (1986) consideraron la fertilidad/infertilidad de los quistes como una posible causa de variación en los patrones observados de la glucosa fosfato isomerasa. A pesar de ello, estos autores diferenciaron las muestras equinas y suinas de las ovinas, caprinas y humanas, presentando las bovinas un patrón intermedio entre ambos tipos.

En Australia, Lymbery & Thompson (1988), empleando 15 sistemas enzimáticos, diferenciaron entre cepas australianas (ovina continental y ovina de Tasmania). Sin embargo, en un estudio realizado al año siguiente, encontraron diferencias en los patrones de esterases inespecíficas de quistes procedentes de un mismo hospedador (Lymbery & Thompson, 1989b), hecho éste que pone en duda la validez de la interpretación de los resultados isoenzimáticos, y que fue el inicio de la controversia antes indicada.

Esta misma variabilidad intracepa ha sido recientemente puesta también de manifiesto en España por Siles (1993), quien diferenció las cepas ovina-bovina-humana, suina y equina a partir del estudio de cinco sistemas isoenzimáticos, en dos de los cuales pudo apreciar dicha variabilidad.

2.2.3.5. Inmunología

La variación intraespecífica puede traducirse en diferencias antigénicas cuantitativas y/o cualitativas entre las distintas cepas. Prueba de ello es el trabajo de Mussiani *et al.* (1978), que encuentran que dos de los antígenos mayoritarios en líquido hidatídico de quistes ovinos y humanos están presentes en menor cantidad en quistes bovinos o suinos. Guisantes (1979), con muestras españolas, encuentra una composición antigénica similar en los aislados ovinos y bovinos, diferente de la presente en los suinos.

Pezella *et al.* (1984) compararon, por inmunodifusión, inmunolectroforesis y contrainmunolectroforesis, líquidos hidatídicos obtenidos de quistes humanos, bovinos y ovinos; las diferencias que observaron entre ellos las consideraron debidas bien a la presencia de cepas distintas en cada hospedador, o bien a cambios o adaptaciones inducidos por el hospedador en los antígenos parasitarios.

Gottstein *et al.* (1987), mediante inmunolectroforesis y Western blot, constataron diferencias entre los patrones antigénicos de aislados bovinos suizos y bovinos australianos. Empleando protoescólices obtenidos de hospedadores de procedencia belga, Janssen *et al.* (1990), mediante Western blot, encontraron también distintas las muestras bovinas de las equinas, suinas y caprinas (éstas muy similares entre ellas). Siles Lucas & Cuesta Bandera (1991a, 1993) y Siles Lucas (1993), en España, también mediante Western blot, empleando sueros homólogos y heterólogos, diferenciaron tres patrones antigénicos diferentes

(ovino-bovino-humano, suino y equino), con bandas características en los patrones suino y equino, que podrían ser cepa-específicas.

Esta variación antigénica es muy posible que influya sobre el inmuno-diagnóstico, ya que, entre otras cosas, la respuesta inmune del hospedador dependerá de la cepa de E. granulosus que albergue (Cameron, 1960; Huldt *et al.*, 1973; Gottstein *et al.*, 1983, 1987). Así, por ejemplo, en Turkana se ha encontrado, en las personas infestadas, una falta aparente de respuesta serológica (Chemtai *et al.*, 1981); en Alaska, Noruega y Canadá, zonas donde está presente la forma nortea del parásito, se ha encontrado una respuesta mínima de anticuerpos en humanos (Wilson *et al.*, 1968; Huldt *et al.*, 1973). En Australia, Craig & Rickard (1981), con antígenos purificados, pudieron distinguir serológicamente las ovejas de Tasmania con y sin hidatidosis; sin embargo, en el continente la distinción no fue posible, debido a la baja respuesta serológica de las ovejas en esta zona, aun cuando albergaran un gran número de quistes. Estos datos fueron confirmados por Lightowlers *et al.* (1984).

2.2.3.6. Análisis de ADN

Los procedimientos para el análisis de ADN, que incluyen, entre otros, el estudio comparativo de los fragmentos obtenidos con enzimas de restricción, Southern blot e hibridación de dichos fragmentos con sondas marcadas radiactivamente, así como la comparación de fragmentos de ADN, utilizando exclusivamente los enzimas de restricción, han sido aplicados a los aislados de E. granulosus procedentes de diferentes áreas endémicas. Los resultados obtenidos hasta ahora indican que este tipo de métodos son válidos para la identificación y caracterización de cepas, con ciertas ventajas sobre otros procedimientos (se examina directamente el genoma), pero también con limitaciones (protocolos complicados, interpretación de resultados que depende del tipo de ADN que se

utilice -Lymbery & Thompson, 1989b-, significación epidemiológica que no tiene por qué ser directa).

McManus & Simpson (1985), con sondas heterólogas, y Rishi & McManus (1987), con sondas específicas, diferenciaron las muestras ovinas y equinas en el Reino Unido. En España, con sondas homólogas y heterólogas, Cuesta Bandera (1988) y Cuesta Bandera *et al.* (1988) encontraron tres patrones de hibridación diferentes: ovino (reproducible también en humanos y bovinos), equino y suino-caprino.

Aplicando la técnica de RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism), Hope *et al.* (1991), en Australia, no encontraron diferencias entre las cepas identificadas mediante otras técnicas. En China, empleando RFLP, PCR (Polymerase Chain Reaction) - RFLP, y análisis del ADN mitocondrial, McManus *et al.* (1994) no han encontrado diferencias entre las 117 muestras (de diferentes especies de hospedador intermediario) analizadas, considerando entonces que sólo existe una única cepa de E. granulosus en China.

Utilizando la técnica RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) (basada en el principio de la PCR), Siles Lucas *et al.* (1993) han diferenciado las cepas ovina, suina y equina españolas. Estas cepas (suina y equina) también parecen existir en Suiza, junto con la cepa bovina suiza, a la vista de los resultados del estudio comparativo realizado por Siles Lucas *et al.* (1994), mediante Southern blot y RAPD.

Mediante la secuenciación de un determinado fragmento de ADN mitocondrial, Bowles *et al.* (1992a) han podido distinguir las cuatro especies reconocidas dentro del género, y varios grupos dentro de E. granulosus.

2.2.4. CEPAS CARACTERIZADAS

A partir de los datos obtenidos, se han reconocido un cierto número de variantes (cepas) en todo el mundo, algunas de las cuales tienen carácter multihospitalario. Hay que destacar que algunas de dichas cepas son comunes a todas las regiones (presentan similitudes en todos, o en la mayor parte, de los criterios empleados en su caracterización; p.e., cepa equina), mientras que otras son variantes locales, con características propias (p.e., cepa bovina suiza). En otros casos, las variantes de distintas zonas que infestan a una misma especie de hospedador intermediario presentan demasiadas características diferenciales como para considerarlas de la misma cepa (p.e., bovina asiática y bovina europea).

Dado que han sido las muestras de origen europeo y australiano las que se han caracterizado con un mayor número de criterios distintos, es de suponer que, aplicando la misma variedad de criterios a las muestras de otras regiones, algunas de las consideradas como cepas locales puedan asimilarse a las reconocidas en otras partes del mundo.

En las siguientes Tablas (4 - 8) se recogen, por continentes, las distintas cepas identificadas y los criterios empleados en dicha identificación; en la Tabla 9 se indican las posibles equivalencias entre dichas cepas.

Tabla 4 - Cepas caracterizadas - Europa.

Cepa	Criterio(s) de identificación
Ovina-Bovina1-Humana	Infestabilidad del hospedador intermediario, fertilidad (alta en ovinos, baja en bovinos), desarrollo larvario experimental, desarrollo del adulto <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i> , prepatencia, morfología larvaria y del adulto, bioquímica (metabolismo, proteínas, isoenzimas, antígenos), análisis de ADN.
Bovina2	Distribución (Suiza, Alemania), infestabilidad hospedador intermediario, fertilidad (alta; baja en los ovinos de la zona), prepatencia, morfología larvaria y del adulto.
Equina	Infestabilidad del hospedador intermediario, fertilidad (alta, baja en ovinos de la zona), desarrollo larvario experimental, desarrollo del adulto <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i> , prepatencia, morfología larvaria y del adulto, bioquímica (metabolismo, proteínas, isoenzimas, antígenos), análisis de ADN.
Suina-Caprina	Infestabilidad del hospedador intermediario, desarrollo larvario experimental, prepatencia, morfología larvaria y del adulto, bioquímica (proteínas, isoenzimas, antígenos), análisis de ADN.

Tabla 5 - Cepas caracterizadas - África.

Cepa	Criterio(s) de identificación
Ovina-Bovina1-Caprina1-Humana1	Infestabilidad del hospedador intermediario, desarrollo larvario natural, morfología larvaria, bioquímica (composición, isoenzimas), análisis de ADN.
Humana2	Distribución (Kenia), epidemiología, fertilidad, respuesta inmune.
Bovina2	Distribución (Suráfrica), fertilidad (alta).
Camello-Caprina2	Desarrollo larvario natural y experimental, morfología larvaria y del adulto, bioquímica (composición, isoenzimas), análisis de ADN.
Caprina3	Bioquímica.
Equina	Morfología larvaria y del adulto.
Silvestre	Hospedador definitivo (león), desarrollo larvario.

Tabla 6 - Cepas caracterizadas - Asia.

Cepa	Criterio(s) de identificación
Ovina-Humana	Infestabilidad del hospedador intermediario, desarrollo larvario natural, fertilidad (media-baja), análisis de ADN.
Búfalo-Bovina	Infestabilidad del hospedador intermediario, fertilidad (alta), morfología, análisis de ADN.
Caprina	Desarrollo larvario natural, morfología.
Silvestre	Hospedador definitivo (chacales).

Tabla 7 - Cepas caracterizadas - América.

Cepa	Criterio(s) de identificación
Ovina-Bovina-Humana	Fertilidad (alta en ovinos, baja en bovinos), morfología larvaria, isoenzimas, análisis de ADN.
Suina	Fertilidad (menor que en ovinos, mayor que en bovinos).
Silvestre (Norteamérica)	Distribución, epidemiología, Infestabilidad del hospedador intermediario, morfología larvaria.

Tabla 8 - Cepas caracterizadas - Oceanía.

Cepa	Criterio(s) de identificación
Ovina1 (*)	Distribución (Australia continental), desarrollo larvario natural y experimental, prepatencia, morfología larvaria y del adulto, bioquímica (proteínas, isoenzimas), respuesta inmune.
Ovina2 (*)	Distribución (Tasmania), desarrollo larvario experimental, prepatencia, morfología larvaria y del adulto, bioquímica (proteínas, isoenzimas), respuesta inmune.
Equina	Morfología larvaria y del adulto, bioquímica (proteínas).
Silvestre (*)	Hospedador definitivo (dingos, quizá también perros), hospedador intermediario (macrópodos), desarrollo larvario natural y experimental, prepatencia, morfología larvaria y del adulto, bioquímica (proteínas).

(*) Las cepas Ovina1, Ovina2 y silvestre podrían ser, por análisis de ADN, una misma cepa.

Tabla 9 - Cepas caracterizadas - posibles correspondencias.

Europa	África	Asia	América	Oceanía
Ovina-Bovina1- -Humana	Ovina-Bovina1- -Caprina1- -Humana1	Ovina-Humana (quizá también Búfalo-Bovina3, Caprina3)	Ovina-Bovina- -Humana (quizá también Suina)	Ovina1
Equina	Equina	Equina	Equina	Equina
Bovina2	Bovina2			
Suina-Caprina				
				Ovina2
	Humana2			
	Camello- -Caprina2			
	Silvestre	Silvestre	Silvestre (N. América)	Silvestre (macrópodos)

2.2.5. IMPORTANCIA PRÁCTICA DEL FENÓMENO DE ESPECIACIÓN

La significación práctica de la variación dentro de Echinococcus debe ser relacionada con las implicaciones que dicha variación tiene en la epidemiología, diagnóstico, tratamiento y control de la hidatidosis.

2.2.5.1. Epidemiología y control

Para poder desarrollar un programa de control efectivo se debe de tener un conocimiento exhaustivo de la dinámica de transmisión del parásito en la región a controlar. Dicho programa de control debería tener en cuenta las posibles implicaciones epidemiológicas que la variabilidad intraespecífica en E. granulosus puede tener: la especificidad por el hospedador intermediario y/o final, y las características del desarrollo del adulto y de la larva.

La especificidad de hospedador es un factor epidemiológico de primera magnitud, sobre todo en las zonas en donde puede haber interacciones entre los ciclos silvestres y domésticos: si el ganado doméstico es susceptible a la infestación por formas silvestres, el programa de control debería contemplar medidas de acción sobre dichos ciclos silvestres.

Del mismo modo, las diferencias de especificidad por el hospedador son también importantes en las zonas endémicas en donde haya varias especies de hospedador intermediario, en todas las cuales el parásito forme quistes fértiles. Esta situación puede ser debida bien a la existencia de una cepa con un gran rango de hospedadores, o bien a la existencia de varias cepas distintas, cada una con especificidad para uno (o unos pocos) de los hospedadores intermediarios presentes. En este caso, los programas de control que consideren como objetivo prioritario la disminución de la incidencia en humanos deben tener en cuenta la posibilidad de que algunas cepas no sean infestantes para el hombre (Thompson, 1995).

Respecto a las características del desarrollo del parásito, la evidencia obtenida sobre las diferencias en el período de prepatencia del adulto en distintas cepas (ver, p.e., Thompson *et al.*, 1984; Eckert *et al.*, 1989, 1993) debe de ser tomada en cuenta en aquellos programas de control que contemplen tratamientos regulares de los hospedadores definitivos con antihelmínticos. En dichos programas, no deberían establecerse períodos fijos entre tratamientos mientras no se conozca con certeza el período de prepatencia de la cepa, o cepas, presentes en la zona.

En lo referente a las diferencias en el desarrollo de la forma larvaria, las variaciones que presentan (o puedan presentar) distintas cepas pueden originar situaciones epidemiológicas poco comunes, que hagan inefectivos los programas de control (p.e., en Suiza se ha observado un desarrollo especial de los quistes en bovinos -quistes fértiles pequeños, localizados en el parénquima pulmonar;

ver Thompson & Lymbery, 1988-; en una inspección veterinaria pueden pasar desapercibidos, de modo que, al ser vendidas las vísceras parasitadas para alimento de perros, éstos pueden tener mayores índices de prevalencia en ciudad que en zonas rurales).

2.2.5.2. Patología

Existe la evidencia de que distintas cepas de E. granulosus pueden variar en su patogénesis en el hospedador intermediario, y de que los efectos clínicos de distintas cepas pueden por tanto diferir. Así, en Kenia y Libia parece existir una cepa particularmente virulenta para humanos (French *et al.*, 1982; Gebreel *et al.*, 1983), mientras que la forma norteña presente en Norte América causa infestaciones "benignas" (Wilson *et al.*, 1968). Sin embargo, la falta de datos experimentales en animales controlados no permite corroborar estas observaciones.

2.2.5.3. Inmunodiagnóstico

La respuesta serológica del hospedador intermediario está influida no solo por la especie sino también por la cepa de Echinococcus. Las diferencias en las características antigénicas entre cepas de E. granulosus puede afectar al desarrollo y efectividad de procedimientos inmunodiagnósticos desarrollados en diferentes países (Thompson, 1995). En consecuencia, dicha heterogeneidad debe ser tomada en cuenta en el desarrollo y elección de procedimientos inmunodiagnósticos en diferentes zonas endémicas, sobre todo en lo referente a los antígenos empleados. Del mismo modo, la elección de antígenos para el desarrollo de vacunas debe tener en cuenta que una vacuna frente a una cepa

puede no provocar una respuesta protectora frente a otra cepa diferente (Thompson, 1995).

2.2.5.4. Terapia

El desarrollo de la misma cepa de E. granulosus en diferentes especies de hospedador intermediario puede provocar cambios metabólicos importantes para la supervivencia del parásito en diferentes ambientes (Bryant & Flockhart, 1986; McManus & Smyth, 1986; Thompson & Lymbery, 1990; Thompson, 1991), pudiendo provocar dichos cambios en las rutas metabólicas, diferentes sensibilidades frente a fármacos cestocidas (Thompson, 1995).

Basándose en las diferencias bioquímicas observadas entre cepas de E. granulosus, varios autores (Saimot *et al.*, 1981; Schantz *et al.*, 1982; Kammerer & Schantz, 1984) han sugerido que las distintas cepas puedan tener susceptibilidades diferentes a fármacos antiparasitarios. El conocimiento de las variaciones que puedan presentarse en determinadas enzimas (fundamentalmente, las que participan en procesos de obtención de energía) puede ser de gran importancia en el desarrollo de quimioterápicos destinados a bloquear dichos procesos (McManus & Smyth, 1982).

2.2.6. SITUACIÓN EN ESPAÑA

2.2.6.1. Prevalencia e incidencia de la Hidatidosis en España

Dentro de la Unión Europea, España es el país con mayor incidencia, con unos valores entre 0,67 y 2,52 casos por 100000 habitantes, en el período 1983-86 (Domínguez *et al.*, 1984; Casanova *et al.*, 1986; anónimo, 1987); sin embar-

go, estas medias nacionales no reflejan totalmente la realidad, ya que existen notables diferencias entre unas regiones y otras: mientras que la incidencia en las Islas Canarias, Baleares, Galicia y Andalucía es casi nula, en el mismo período de tiempo (1983-86), en Castilla y León, los valores medios oscilaron entre 3,2-11,9/100.000 habitantes, con picos en Soria y Ávila (25 y 30/100.000 habitantes, respectivamente); en Castilla-La Mancha la media osciló entre 3,3 y 7,8, subiendo hasta 62/100.000 habitantes en Guadalajara (revisado por Rojo, 1993).

La valoración de la incidencia de esta parasitosis se realiza en base a encuestas serológicas y, principalmente, en base a registros hospitalarios (mediante el sistema de Enfermedades de Declaración Obligatoria -EDO- y Encuestas de Morbilidad Hospitalaria), y, en el caso de animales, a través de la comunicación de decomisos en mataderos (Cal, 1990). A partir de estos datos, se puede observar que el principal grupo de riesgo es la población rural (72% de los casos recogidos en los EDOs de 1987-1988), con una incidencia algo mayor sobre hombres que sobre mujeres; según Cal (1990), la población de alto riesgo estaría constituida por pastores y propietarios de perros. Respecto a la edad, se puede observar una mayor incidencia en el grupo de edad de 50-60 años en adelante, pero esto puede ser debido a la aparición de casos que, debido al lento crecimiento de los quistes, han estado latentes durante años.

La distribución de la hidatidosis por Autonomías revela que esta parasitosis se presenta sobre todo en la zona centro peninsular (Castilla-La Mancha, Castilla y León, Aragón, Navarra, La Rioja, Extremadura y Madrid). Comparando esta distribución con las zonas de explotación ganadera, se puede observar que la hidatidosis humana está íntimamente ligada a la convivencia del hombre con el binomio perro/oveja, ya que se presenta fundamentalmente en las zonas en donde la ganadería ovina es una actividad importante. En muchas de esas

zonas, no son infrecuentes incidencias de 20-50 por 100.000 habitantes, como en La Rioja, Zaragoza o Madrid, según datos de la Encuesta de Morbilidad Hospitalaria (Nájera, 1984). En esas provincias, la difusión y perpetuación de la hidatidosis se ve favorecida, sobre todo, por los siguientes factores (Rojo, 1993):

- la gran dependencia de la ganadería tradicional, con un número de ovinos elevado y una estrecha convivencia hombre/perro/oveja;
- la escasa o nula educación sanitaria de la población;
- el "desproporcionado" censo canino por habitante, con un alto porcentaje de perros vagabundos y deficiente atención sanitaria de los censados;
- la práctica, todavía extendida, de sacrificios domiciliarios y de urgencia, de animales domésticos;
- la deficiente infraestructura en mataderos controlados, abastecimiento público de agua, destrucción de decomisos, y escasez (o ausencia) de cementerios de animales.

La incidencia que la parasitosis tiene sobre el ganado doméstico ha sido recientemente revisada por Rojo (1993), a partir de datos obtenidos de encuestas serológicas y de decomisos en mataderos. El ganado ovino es el que mayores valores de prevalencia presenta (hasta el 90%, en algunas partidas sacrificadas -anónimo, 1990-). A continuación estaría el ganado caprino, con valores de hasta un 25% de prevalencia (en Extremadura; Carmona *et al.*, 1984); los bovinos y equinos, con valores inferiores al 10%; y el ganado suino, con prevalencias inferiores al 1%, aunque pueden superar el 4% en Extremadura (Carmona *et al.*, 1984). Respecto a animales salvajes, son muy pocos los datos disponibles, refiriéndose únicamente a jabalíes; en La Rioja, en 1988, se detectaron parasitados casi el 7% de los animales cazados; sin embargo, en Navarra, no se encontró ningún quiste en jabalí en la temporada de caza 1992-93 (Beguiristain & Fernández, 1993).

Los distintos programas de control, puestos en marcha durante los años '80 y principios de los '90 por distintas comunidades autónomas (Extremadura, 1983; Navarra, 1985; La Rioja, 1987; Madrid, 1988; Castilla-La Mancha, 1988; Aragón, 1989; Castilla y León, 1992), pretenden disminuir y erradicar la parasitosis, en líneas generales, mediante la eliminación de adultos de los perros (bien mediante tratamientos periódicos con praziquantel, bien mediante la retirada de perros vagabundos y asilvestrados), y mediante la concienciación de la población, tanto en costumbres higiénicas como de sacrificio de reses y eliminación de restos de las mismas. Aunque algunos de los programas llevan relativamente poco tiempo en marcha, los resultados obtenidos hasta el momento han sido satisfactorios. En las conclusiones obtenidas en la última Reunión de Evaluación de los Programas de Prevención y Control de la Hidatidosis, celebrada en Sigüenza el 29-30 de Junio de 1994 (datos no publicados), se consideran como positivos los resultados presentados en dicha reunión por la mayoría de los representantes de las distintas Comunidades Autónomas en las que se llevan actualmente a cabo programas de lucha antihidatídica; los esfuerzos realizados en campos como Educación Sanitaria y control de perros vagabundos, entre otros, han tenido su recompensa en la disminución de los niveles de infestación en animales de abasto (fundamentalmente, ovinos, aunque también se indicaron datos de bovinos, caprinos y porcinos en Extremadura) y en el hombre.

2.2.6.2. Distribución geográfica y ciclos epidemiológicos

En España pueden diferenciarse tres regiones, en lo que a distribución y epidemiología de la hidatidosis se refiere:

- una amplia zona que abarcaría las Comunidades Autónomas de Castilla y León, Castilla-La Mancha, Extremadura, Navarra y Aragón, y la región noroccidental de Cataluña y el norte de Andalucía; en estas zonas los índices de prevalencia son altos, tanto para la equinococosis canina como para la hidatidosis animal y humana. El principal hospedador intermediario sería el ganado ovino, seguido del bovino, caprino, equino y suino.
- Una segunda zona, con características epidemiológicas propias, estaría formada por la Comunidad Valenciana, Murcia y el resto de Andalucía; en estas áreas se registran índices de prevalencia canina considerables, mientras que la hidatidosis humana y animal es escasa. El hospedador intermedario habitual parece ser la cabra; el parásito también se encuentra a veces en cerdos, y, de forma aún más esporádica, en otras especies animales. Fue en esta zona (concretamente en Almería) donde López Neyra y Soler Planas, en 1946, describieron la especie E. intermedius, posteriormente invalidada.
- La tercera región incluiría la cornisa cantábrica y Galicia, con índices de prevalencia bajos, tanto en equinococosis como en hidatidosis humana y animal, aunque no hay demasiados datos al respecto. Los hospedadores intermediarios habituales en estas áreas son sobre todo los bóvidos, aunque también pueden serlo los équidos y suidos.

Además, en algunas regiones (p.e., La Rioja) se han detectado casos de hospedadores silvestres, lo que podría indicar la existencia de un ciclo silvestre entre lobos y jabalíes, u otros animales, quizá interconectado con los ciclos domésticos de la zona.

2.2.6.3. Estudios sobre el fenómeno de especiación de E. granulosus, realizados en España

Ante las peculiaridades epidemiológicas mencionadas anteriormente, y teniendo en cuenta la existencia, puesta de manifiesto por distintos investigadores, de cepas del parásito en otros países, se consideró la posibilidad de que el parásito no fuese tampoco una especie uniforme en nuestro país. Este supuesto fue confirmado por Cuesta Bandera (1988) y Cuesta Bandera *et al.* (1988), quienes, mediante el empleo de enzimas de restricción, Southern blot e hibridación con sondas marcadas, diferenciaron tres patrones de hibridación de ADN diferentes en muestras españolas (ovino-bovino-humano, equino y suino-caprino), a la vez que comprobaron la similitud de los aislados ovinos y equinos con los correspondientes aislados británicos.

A partir de estos datos se inicia en nuestro Departamento una línea de investigación encaminada a la caracterización más detallada de las cepas identificadas, aplicando diversos criterios (bioquímicos, inmunológicos, genéticos -Siles Lucas, 1993-, y los recogidos en esta Memoria). Los datos hasta el momento publicados muestran diferencias en los patrones proteicos de líquidos hidatídicos de las distintas cepas, analizados mediante SDS-PAGE (Siles Lucas & Cuesta Bandera, 1990), así como también en los patrones antigénicos, analizados mediante Western blot (Siles Lucas & Cuesta Bandera, 1991a, 1993), y en los análisis genéticos mediante RAPD (Siles Lucas *et al.*, 1993, 1994). Entre las conclusiones que se obtienen de estos estudios están que en España existen al menos tres ciclos epidemiológicos (perro/oveja, vaca; perro/équidos; y perro/cerdo, cabra), y que, con los datos disponibles, sólo la cepa ovina parece ser infestante para el hombre (Siles Lucas, 1993).

2.3. REVISIÓN DE LAS TÉCNICAS ELEGIDAS PARA ESTE ESTUDIO

2.3.1. CULTIVOS *IN VITRO*

2.3.1.1. Introducción

2.3.1.1.1. Problemas del cultivo *in vitro* de cestodos

El desarrollo en condiciones experimentales de cualquier organismo presenta una serie de problemas, algunos relacionados con el animal, otros con la técnica necesaria para establecer dicho desarrollo. En el caso de los cestodos, que poseen dos (o más) hospedadores en su ciclo biológico, el cultivo *in vitro* de muchas especies puede llegar a ser muy complicado. De modo general, los factores a tener en cuenta a la hora de establecer un cultivo *in vitro* de estos organismos han sido revisados por Smyth (1990a, b), haciendo fundamentalmente referencia a la reproducción de las características físico-químicas y nutritivas del órgano (u órganos) en que el parásito se localiza, al aporte de los nutrientes que éste necesita, a la eliminación de las sustancias de desecho del cultivo, a la esterilidad necesaria para el desarrollo normal de la mayoría de las especies, y a la presencia de los estímulos de desarrollo necesarios para que el parásito evolucione a los distintos estadios de su ciclo. Todos estos puntos son completamente aplicables al caso de Echinococcus.

En referencia al último punto mencionado (estímulos de desarrollo), hay que hacer especial mención de la capacidad que los protoescólices de Echinococcus tienen, *in vivo*, de desarrollarse hacia la formación de quistes (si se liberan en el interior del hospedador intermediario) o de vermes segmentados sexualmente maduros (si son ingeridos por el hospedador definitivo). Los factores que regulan este proceso de diferenciación hacia la larva o hacia el adulto han sido

y siguen siendo un enigma; si bien actualmente se conocen las condiciones para reproducir *in vitro* ambos tipos de desarrollo, cualquier variación en el procesamiento de las muestras, o en las condiciones de los cultivos, pueden causar una evolución anómala de éstos, o su degeneración. Además, queda también por resolver cuáles son los factores que regulan la producción de huevos viables *in vitro*.

2.3.1.1.2. Procesamiento y mantenimiento de las muestras

Hay dos puntos de partida para el cultivo *in vitro* de este parásito: a partir de quistes o de huevos. Los primeros son fáciles de obtener, proporcionan protoescólices en condiciones estériles, y son relativamente seguros en su manejo. Por el contrario, los huevos (poseyendo en su interior la oncosfera, infectiva) presentan un serio riesgo de infestación, se necesitan unas condiciones especiales para mantener los perros a partir de los cuales obtener dichos huevos, y puede haber problemas de contaminación de las muestras con la microflora intestinal del hospedador. En consecuencia, han sido los protoescólices el material de elección para este tipo de estudios, con la ventaja añadida de que, de conseguirse el desarrollo completo, no sería necesario mantener perros infestados como fuente de obtención de huevos del parásito. No obstante, se han realizado varios trabajos sobre el cultivo de oncosferas obtenidas de infestaciones experimentales en perros (Heath & Smyth, 1970; Heath & Lawrence, 1976, 1981; Harris *et al.*, 1989), sobre el cultivo de vermes parcialmente desarrollados *in vivo* (Smyth & Howkins, 1966; Thompson & Smyth, 1976; Thompson, 1977; Kumaratilake & Thompson, 1981; Thompson & Eckert, 1982; Kumaratilake *et al.*, 1983), y sobre el desarrollo experimental completo del adulto (por el momento, sólo de *E. multilocularis*) en roedores (Kamiya & Sato, 1990a, b; revisado por Howell & Smyth, 1995).

La obtención y el transporte del material parasitario (quistes hidatídicos) no presenta unos problemas especiales, aunque deben mantenerse unas precauciones mínimas. Smyth & Davies (1974) y Smyth (1979) han revisado algunas de las dificultades que pueden encontrarse en la manipulación de las muestras. Básicamente, indican que se eviten calentamientos o congelaciones, golpes (que pueden causar roturas en los quistes y una posible contaminación de los mismos), o períodos de tiempo superiores a las 24 horas desde la extirpación del hospedador hasta el procesado de la muestra.

El procedimiento para la extracción en condiciones estériles de la arena hidatídica (protoescólices y cápsulas prolíferas) ha sido descrito por Smyth & Davies (1974) y Smyth (1979, 1985), y consiste, básicamente, en la tinción de la superficie del quiste con un desinfectante (alcohol iodado) y la extracción de parte del líquido hidatídico con una jeringuilla, antes de proceder a la apertura del mismo, para disminuir la presión. Aunque es posible obtener dicha arena a partir de quistes no diseccionados en condiciones estériles, dichos autores recomiendan el trabajo en cabinas de flujo laminar. Una vez obtenida la arena hidatídica, ésta puede ser almacenada durante cortos períodos de tiempo, o procesada (mediante una digestión artificial con pepsina) para liberar los protoescólices y establecer los cultivos.

Los factores más importantes a tener en cuenta a la hora de establecer los cultivos son la esterilidad del material, la viabilidad de los protoescólices, y las características de las sustancias que se emplean en el procesado de la muestra (fundamentalmente, el tipo de sales biliares y la pepsina) (Howell, 1986). Las muestras que presenten en torno a un 40% de protoescólices muertos se han mostrado poco aptas para cultivos *in vitro* (Smyth & Davies, 1974; Howell, 1986; Smyth, 1990b). Como criterios de viabilidad, estos autores consideran la motilidad del protoescólex (estimulada, si es necesario, por la adición de algunas gotas de bilis), la de los solenocitos, o la tinción con colorantes vitales.

La liberación de los protoescólices se produce tras una digestión artificial de la arena hidatídica con pepsina (Bénex, 1968b, realiza una digestión posterior con tripsina), eliminándose así los restos de membranas quísticas y de cápsulas prolíferas, y los protoescólices muertos. Dado que no todos los lotes de pepsina dan los mismos resultados, Howell (1986) considera conveniente la estandarización del proceso con un lote que se haya probado válido. Del mismo modo, si durante el procesado se emplea, para promover la evaginación de los protoescólices, preparados comerciales de sales biliares en vez de bilis de perro, hay que tener cuidado con la composición del lote empleado, ya que se ha comprobado que dichos preparados, que son una mezcla de varios tipos de sales biliares, incluyen en ocasiones deoxicolato sódico, el cual provoca la lisis de los protoescólices (Smyth, 1962a, 1990b; Howell, 1986).

Otro factor a tener en cuenta durante la digestión péptica de las muestras es el tiempo que son mantenidas en dicha digestión. El proceso debe durar en torno a los 15-45 minutos, debiéndose dar por concluido cuando todos los protoescólices han sido liberados de las cápsulas (Smyth, 1967, 1985, 1990b; Smyth & Davies, 1974). Se ha observado que períodos de tiempo de digestión prolongados provocan un aumento en el número de individuos que se desarrollan hacia la formación de microquistes (Smyth, 1967; Heath & Osborn, 1976).

Hay numerosos estudios sobre la posibilidad de mantener los protoescólices conservados durante períodos prolongados de tiempo, manteniendo su viabilidad. En la mayoría de los casos, los máximos períodos de supervivencia se han conseguido manteniendo a temperaturas de 2-10°C los quistes intactos (Wikerhauser, 1969; Andersen & Loveless, 1978; Deka *et al.*, 1982; Jensen *et al.*, 1984) o los protoescólices (libres o formando parte de la arena hidatídica) (Gelormini, 1941; Schwabe *et al.*, 1963; Bénex, 1968a; Barriga, 1971; Andersen & Loveless, 1978; Saad & El-Abin, 1982; Casado Escribano *et al.*, 1986; Casado Escribano, 1987; Casado Escribano & Rodríguez-Caabeiro, 1988b). Resultados similares se han obtenido con E. multilocularis (Jensen *et al.*, 1984; Ohnishi *et al.*, 1984), habiéndose logrado, además, la criopreservación de metacestodos y

posterior proliferación en infestaciones experimentales en roedores (Eckert & Ramp, 1985). En las distintas experiencias, la viabilidad de los protoescólices se ha determinado mediante el empleo de alguno de los parámetros de viabilidad ya indicados, comprobando *in vivo* la capacidad de desarrollo hacia el adulto o hacia la larva, o mediante estudios ultraestructurales del tegumento.

2.3.1.2. Cultivos en dirección vesicular

2.3.1.2.1. Desarrollo de la técnica de cultivo. Estudios realizados.

Fue durante la década de los '60 cuando se estableció la técnica de cultivo de E. granulosus en dirección vesicular. Con anterioridad, los franceses Dévé y Coutelen realizaron varios experimentos que, durante casi 30 años, no tuvieron continuación.

Los primeros ensayos fueron realizados por Dévé en 1901 y 1902, intentando el cultivo de arena hidatídica en líquido ascítico humano. Sin embargo, tras 28 días de cultivo, todos los protoescólices aparecieron muertos, degenerados y sin modificaciones evolutivas reconocibles. Posteriormente, en 1926, cultivó protoescólices en líquido hidatídico suplementado con suero de caballo sin inactivar, obteniendo, al cabo de 14 días, formas vesiculares 2 ó 3 veces más grandes que los protoescólices iniciales. Coutelen (1927a, b), empleando protoescólices de quistes suinos, utilizó varios medios bacteriológicos, con resultados negativos; sin embargo, con líquido hidatídico suplementado con extractos de órganos o líquido ascítico, obtuvo formas vesiculares de gran tamaño, mantenidas hasta 31 días en cultivo. Dévé (1928), con líquido hidatídico y líquido ascítico humano a partes iguales, a 37°C y sin renovación del medio, mantuvo los cultivos durante 43 días, obteniendo pequeñas vesículas con delgadas *cutículas* laminares (= membranas laminares).

En 1957, Rausch & Jentoft describieron algunos experimentos preliminares con E. multilocularis. Emplearon un medio base formado por líquido ascítico al 40% en solución salina de Hanks, con antibióticos, suplementado con nutrientes de origen natural (p.e., extracto de embriones de ratón); en algunos cultivos utilizaron también células HeLa. Como material de partida emplearon membranas germinales indiferenciadas, no protoescólices. En los mejores resultados obtuvieron vesículas a los 29 días de cultivo; en algunos casos, a los 55 días aparecieron protoescólices en dichas vesículas. El tiempo máximo de mantenimiento de los cultivos fue de 134 días.

Cameron (1960) describió unos experimentos también preliminares del cultivo *in vitro* de E. multilocularis, aunque sin dar detalles técnicos. Fue más tarde, con los trabajos de Smyth (1962b), Yamashita *et al.* (1962) y Webster & Cameron (1963) (revisados por Smyth, 1964, y Silverman, 1965), cuando la técnica de cultivo quedó más o menos establecida.

Yamashita *et al.* (1962), trabajando con E. multilocularis en Japón, y Smyth (1962) con E. granulosus en Australia, obtuvieron unos resultados casi idénticos. Yamashita *et al.* emplearon un medio básico de lactoalbúmina hidrolizada al 0.5% en solución salina de Hanks, suplementado con suero bovino, bilis bovina y extracto de hígado. Dichos autores trataron las cápsulas prolíferas con tripsina antes de iniciar los cultivos, para liberar los protoescólices.

Smyth empleó diversos medios líquidos, tanto naturales (líquido hidatídico, suero bovino, líquido amniótico bovino) como preparados (extracto de embriones de pollo y bovinos, medios comerciales -Parker 199-), y combinaciones de los mismos, como medios de cultivo. Utilizó pepsina para liberar los protoescólices antes de iniciar los cultivos. El resultado de los mismos fue la obtención de quistes con membrana laminar, al cabo de 30-50 días de cultivo. Observó que dichos quistes podían obtenerse mediante dos mecanismos de desarrollo: por vacuolización del protoescólex y posterior aparición de la membrana laminar,

rodeándole; o a partir de una exovesícula desarrollada en la zona posterior del protoescólex, que crece y acaba formando alrededor la membrana laminar.

Los resultados de Webster & Cameron (1963), empleando 46 medios distintos, fueron similares a los obtenidos por Smyth (1962b) y Yamashita *et al.* (1962), observando microquistes con membrana laminar a las 3-4 semanas de cultivo; en algunos medios complejos, además, obtuvieron un cierto desarrollo estrobilar con E. multilocularis. Estos autores concluyeron que más de un 5% de suero en cualquiera de los medios ensayados induce la vesiculización.

Gurri (1963) realizó pruebas comparadas *in vivo* e *in vitro* del desarrollo de protoescólices de E. granulosus. Empleó un medio sintético formado por solución de Hanks, suplementado con lactoalbúmina, diversos aminoácidos y vitaminas, un 20% de suero de caballo, y antibióticos. Tras 125 días de cultivo no observó mas que excepcionalmente una ligera membrana laminar en algunos individuos. Sin embargo, *in vivo*, empleando protoescólices del mismo origen, sí se desarrollaron membranas laminares. En base a ello, atribuyó la formación de la membrana laminar a las relaciones parásito-hospedador, aun cuando dicha membrana tendría un origen parasitario.

Lukashenko (1964) cultivó protoescólices y membranas germinales de E. multilocularis; los mejores resultados los obtuvo empleando, como medio base, Parker 199 suplementado con extracto embrionario de ratón, suero bovino y lactoalbúmina. A los 17-19 días de cultivo observó la aparición de vesículas, que desarrollaron membrana laminar a los 55 días. A los 100 días aparecieron protoescólices, cuya viabilidad fue confirmada por desarrollo en perros.

Pauluzzi *et al.* (1965), con E. granulosus, obtuvieron desarrollos vesiculares y formación de membrana laminar con un gran número de medios, pero principalmente con las combinaciones de medio Parker 199 y varios sueros animales.

En 1966, Smyth *et al.* establecieron las condiciones necesarias para el desarrollo en dirección estrobilar de los protoescólices de E. granulosus: la presencia de un sustrato sólido orgánico, y de un tratamiento previo de evaginación de los protoescólices. A partir de este momento, se hablará de cultivos monofásicos, útiles en la evolución vesicular, y de cultivos bifásicos, para desarrollos estrobilares. Posteriormente, Smyth (1967) determinó los factores que controlan la diferenciación de los protoescólices en ambas direcciones. Respecto a los desarrollos vesiculares, este autor estableció como medio básico el formado por medio Parker 199 suplementado con un 20% de líquido hidatídico. Además, entre los factores físicos que pueden influir en el proceso, encontró que bajo condiciones anaeróbicas o con grandes presiones parciales de oxígeno (95%), los protoescólices rápidamente vesiculaban, mientras que con niveles de oxígeno del 10-20%, esto no ocurría. Del mismo modo, pH bajos (≤ 6.5) o altos (≥ 8.0) también inducían la vesiculización, y no a pH de 7.0-7.4. Dado que niveles altos de bilis causaban el mismo efecto, concluyó que el proceso de vesiculización se produce, *in vitro*, por casi cualquier condición anormal.

Todos los datos publicados hasta este momento fueron revisados por Smyth (1968, 1969), sugiriendo que la falta de algunos constituyentes en el medio podría ser la causa de la no formación de la membrana laminar en condiciones *in vitro*.

Bénex (1968b,c), empleando medio Parker 199 y suero de pollo o líquido amniótico, observó la formación de microquistes con membrana laminar a partir de fragmentos de membrana germinal; sin embargo, a partir de protoescólices, observó vesículas con pared gruesa, pero sin laminaciones. En base a ello, consideró indispensable la presencia de fragmentos de membrana germinal en la obtención de quistes secundarios; los protoescólices desprovistos de membranas germinales serían incapaces de formar microquistes con laminaciones.

Brudnjak *et al.* (1970) realizaron cultivos de protoescólices y cápsulas prolíferas, empleando medios que incluían diferentes tipos celulares de mamíferos, Parker 199 con suero fetal, o solución de Hanks con lactoalbúmina y suero. Obtuvieron microquistes con membrana laminar a partir de formas vacuolizadas (no a partir de vesículas posteriores) en 40 días, observando una mayor supervivencia en aquellos medios que incluían células que en los carentes de ellas.

Las experiencias llevadas a cabo en 1976 por Heath & Osborn, empleando un medio de composición química definida (NCTC 135), sin macromoléculas, con el cual obtuvieron microquistes con membrana laminar al cabo de 17 días de cultivo, mostraron que el origen de dicha membrana laminar en los quistes desarrollados *in vitro* es parasitario, atribuyendo las diferencias en tiempo obtenidas por diversos autores a la diferente cantidad de hexosaminas presentes en los diversos medios base de cultivo empleados, y confirmando así el supuesto de Smyth (1968).

Los datos aportados por Kassis & Tanner (1978), que observan que sueros normales de diferentes animales pueden provocar la lisis *in vitro* de los protoescólices de E. granulosus y E. multilocularis, y la desaparición de dicho efecto lítico tras calentamiento del suero a 56°C durante 30 minutos, permitieron mejorar la técnica de los cultivos *in vitro*, tanto en dirección vesicular como estrobilar. Estos datos fueron posteriormente confirmados por Heath & Lawrence (1981), estudiando el desarrollo de oncosferas en presencia de suero de ovejas parasitadas y no parasitadas.

Las últimas aportaciones a la técnica de cultivo vesicular del parásito han sido realizadas por Casado Escribano & Rodríguez-Caabeiro (1988a,c), quienes compararon el efecto que sobre el desarrollo de protoescólices ovinos podrían tener diversos medios de cultivo (Parker 199, CMRL 1066 y RPMI 1640) y diferentes valores de pH. Sus resultados confirmaron los observados por Smyth (1967), relativos al pH, considerando como más adecuado un pH en torno a 8.0. Cual-

quiera de los medios empleados fue apto para el desarrollo vesicular, obteniendo microquistes al cabo de 9-15 días, según el medio considerado.

En las revisiones de Howell (1986), Arme (1987) y Smyth (1990b) se describe la técnica de cultivo establecida para el desarrollo vesicular de los protoescólices de Echinococcus. Smyth considera como adecuado para este tipo de cultivos, cualquier medio líquido bien balanceado en lo que a su composición química se refiere (preferiblemente, medios artificiales, cuya composición es conocida; p.e., NCTC 135, CMRL 1066, Parker 199), y suplementado con suero fetal (20% en volumen), a un pH en torno a 7.4. Durante los primeros días de cultivo se aconseja emplear también antibióticos (penicilina, ampicilina, estreptomycin), para evitar posibles contaminaciones bacterianas.

Aplicando esta técnica de cultivo, los quistes obtenidos *in vitro* desarrollan también la membrana germinal, como han mostrado Rodríguez-Caabeiro & Casado Escribano (1988). Así mismo, cuando se implantan *in vivo* en ratones, mantienen su viabilidad, aun después de largos períodos de cultivo (90 días) (Casado Escribano *et al.*, 1992).

2.3.1.2.2. Secuencias de desarrollo observadas

Las distintas formas morfológicas que pueden aparecer en un cultivo vesicular vienen recogidas en la Figura 7. Smyth (1962b, 1967) señaló los dos procesos básicos de desarrollo que pueden encontrarse en los cultivos vesiculares: por vacuolización del protoescólex (tanto invaginado como evaginado), y recubrimiento del mismo con una membrana laminar, o por formación de una vesícula posterior, que es la que se rodea de laminaciones, eventualmente extendidas al resto del protoescólex. La evolución de ambos tipos de desarrollo ha sido posteriormente descrita, mediante microscopía electrónica, por Casado Escribano & Rodríguez-Caabeiro (1989, 1990).

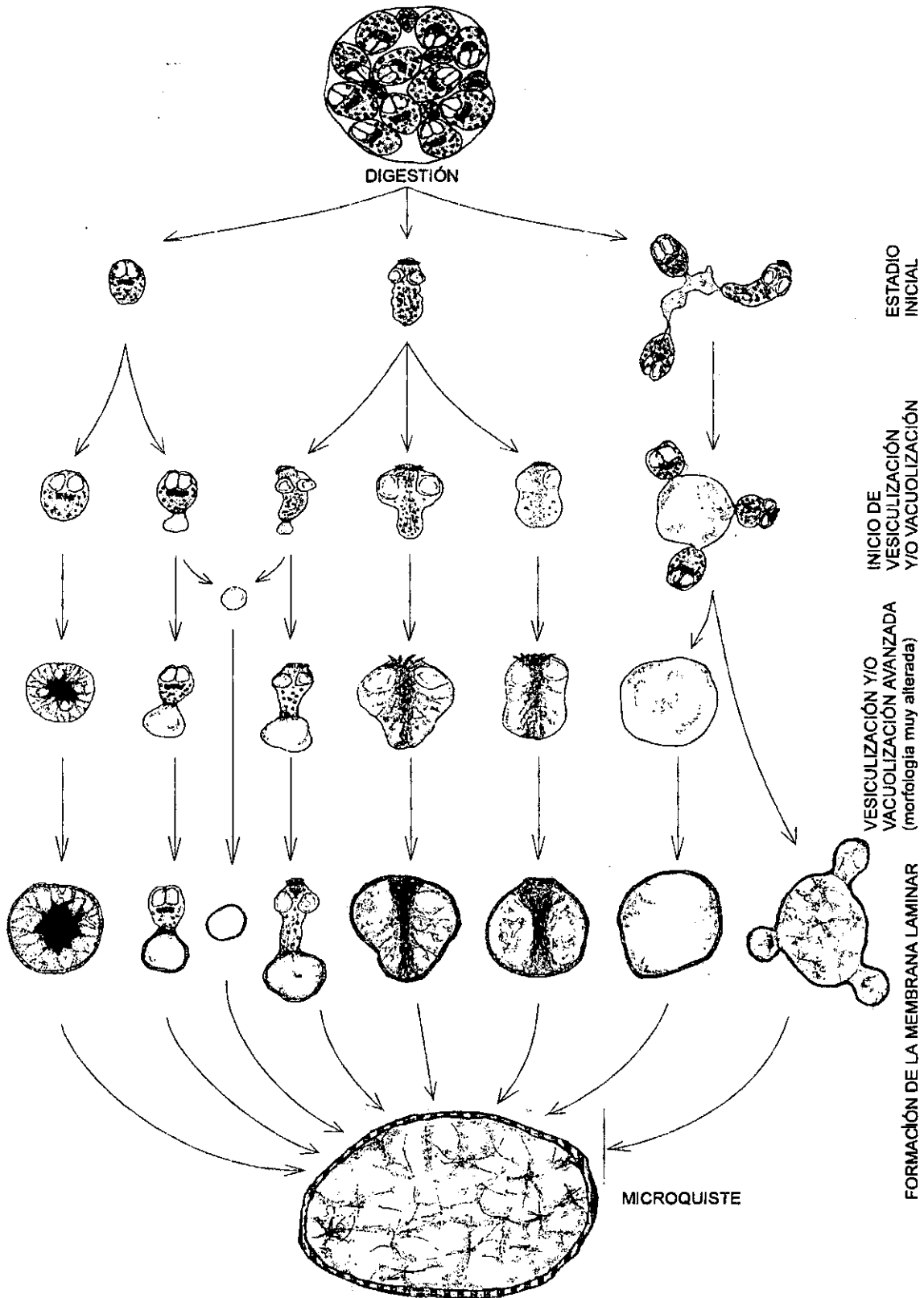


Figura 7 - Estadios evolutivos y tipos morfológicos observados en los desarrollos vesiculares *in vitro* (a partir de Smyth, 1962b; Heath & Osborn, 1976; Rogan & Richards, 1986; Casado, 1987).

Estos mismos patrones de desarrollo han sido observados por otros autores, aunque notándose en ocasiones ciertas diferencias respecto a los tipos morfológicos que acaban originando microquistes. Así, Bénex (1968b) y Brudnjak *et al.* (1970) observaron que sólo las formas vesiculares con restos de la pared de la cápsula prolígera (restos de la membrana germinal) forman microquistes; el desarrollo de vesículas posteriores estaría asociado con la pérdida completa de la membrana germinal y una aparente incapacidad para desarrollarse hacia microquistes. Heath & Osborn (1976) realizaron unas observaciones similares, si bien encontraron que la coalescencia de las vesículas posteriores de varios protoescólices (10 a 40) podía originar una vesícula que sí formase membrana laminar. Howell (1986) encuentra difícil explicar el motivo de las diferencias entre estas observaciones y las de Smyth; una de las posibles razones es que en las experiencias de éste quedasen restos de células germinales en el extremo de las vesículas, siendo dichas células las responsables de la formación de las laminaciones. En cualquier caso, considera que la membrana germinal ejerce una gran influencia en el desarrollo posterior del protoescólex.

Rogan & Richards (1986), con material de origen equino, observaron algunas diferencias en el proceso de desarrollo de los microquistes, respecto al proceso descrito por Smyth (1962b, 1967) con muestras ovinas. Estos autores observaron la formación de microquistes al cabo de 20-30 días, formándose éstos a partir de protoescólices vesiculados, a partir de restos evertidos de cápsulas prolígeras (sin protoescólices adheridos), o a partir de exovesículas liberadas del protoescólex y cuya evolución fue, por tanto, independiente de éstos. Casado Escribano (1987) considera que esta liberación de las vesículas puede tener un origen mecánico, debido a la agitación a la que dichos cultivos fueron mantenidos durante la experiencia. En las exovesículas que permanecieron unidas a los protoescólices, Rogan & Richards no observaron la formación de membrana laminar, como tampoco la observaron a partir de cápsulas prolígeras con protoescólices adheridos, salvo ocasionalmente y a partir del día 70 de cultivo. Estos autores consideran que la unión de los protoescólices a las exovesículas o a las cápsulas inhibe el desarrollo quístico de estas estructuras.

Es de destacar que, en cultivos de protoescólices y/o membranas germinales de E. multilocularis, se han obtenido protoescólices desarrollados a partir de los quistes obtenidos *in vitro* (Rausch & Jentoft, 1957; Lukashenko, 1964); con E. granulosus, sin embargo, esto no ha sido observado hasta el momento, incluso tras períodos de 8 meses de cultivo (Smyth, 1985). Howell (1986) y Howell & Smyth (1995) señalan 6 posibles causas:

- la membrana laminar evita de alguna forma que las células de la membrana germinal obtengan los nutrientes necesarios para una diferenciación posterior;
- falta algún estímulo de desarrollo en los cultivos;
- los quistes desarrollados no llegan a alcanzar los valores críticos de tamaño (en torno a 6 mm) y contenido en agua (95%), aparentemente necesarios para alcanzar el grado de fertilidad (Heath, 1970);
- el desarrollo quístico *in vitro* puede ser un patrón anormal y terminal de desarrollo, producido como consecuencia de condiciones ambientales desfavorables (consideradas por Smyth, 1967, como factores importantes en la inducción del proceso de vesiculización);
- falta de algunas características físico-químicas, no determinadas, de los cultivos; o
- son necesarios largos períodos de tiempo para que el desarrollo de las cápsulas y los protoescólices pueda tener lugar.

2.3.1.3. Cultivos en dirección estrobilar

2.3.1.3.1. Desarrollo de la técnica de cultivo. Estudios realizados

Los primeros intentos de obtener el desarrollo en dirección estrobilar de los protoescólices de Echinococcus terminaron en desarrollos vesiculares, aun cuando se variasen una gran cantidad de parámetros físico-químicos (revisado

por Smyth *et al.*, 1966). Esto llevó a pensar en la falta de algún estímulo, o de algún nutriente, que fuera necesario para que se iniciase dicho desarrollo estrobilar. A partir de un cuidadoso examen de la relación entre el verme adulto y el intestino del hospedador definitivo (Smyth, 1964; Ugolev, 1965; Smyth *et al.*, 1966, 1967; Smyth & Smyth, 1969), observándose el estrecho contacto existente entre el rostelo del parásito y la cripta de Lieberkühn, se consideró necesaria la presencia de un soporte sólido que proporcionara los nutrientes y/o los estímulos de contacto necesarios para que se produjera el desarrollo hacia la forma adulta del parásito.

Si bien hay trabajos previos en los que se menciona el desarrollo de vermes segmentados (Webster & Cameron, 1963; Lukashenko, 1964), fue el trabajo de Smyth *et al.* (1966) el punto de partida para la realización de cultivos en dirección estrobilar de Echinococcus. En dicho trabajo se establece la necesidad de una fase sólida de naturaleza orgánica (suero coagulado) para que los protoescolices de E. granulosus se desarrollen hacia individuos adultos. Del mismo modo, también se establece como requisito la necesidad de evaginar los protoescolices; con ello, las microtriquias presentes en la zona anterior del escolix pueden ponerse en contacto con el sustrato proteico, lo cual, según estos autores, parece inducir la segmentación. Dicha evaginación fue provocada mediante una digestión artificial con pepsina, seguida del tratamiento con tripsina, pancreatina y bilis de perro. Una vez evaginados, los protoescolices fueron puestos en cultivo, con una fase líquida formada por medio Parker 199 adicionado con un 20% de líquido hidatídico, y una fase sólida constituida por suero bovino o canino coagulado. Emplearon también una fase gaseosa formada por un 8.8% de oxígeno y un 5% de anhídrido carbónico. El resultado fue la aparición de individuos segmentados a los 32 días de cultivo, y la obtención de vermes con 3 proglótides, a los 60 días. En ningún caso se observó un desarrollo patente de los órganos sexuales, ni la producción de huevos. Sin embargo, empleando una técnica mixta *in vivo-in vitro*, Smyth & Howkins (1966), cultivando vermes desarrollados previamente durante 28-38 días en perros, obtuvieron huevos embrionados.

En 1967, Smyth analizó conjuntamente los factores que influyen en los desarrollos vesiculares y estrobilares de E. granulosus, considerando como los más importantes, para el desarrollo estrobilar, el proceso de evaginación, la presencia de bilis en el medio, y la existencia de un suero coagulado como sustrato sólido. En este trabajo, señaló que el empleo de soluciones evaginadoras sólo acelera el proceso de evaginación, pero que éstas no aumentan el porcentaje final de individuos evaginados. También indicó que el cambio de Parker 199 por Parker 858 como medio base, permite la espermatogénesis y ovogénesis *in vitro*.

En una publicación posterior, Smyth *et al.* (1967) establecieron siete estadios diferentes en la evolución estrobilar *in vivo*, como referencia para determinar el desarrollo alcanzado *in vitro*, así como la influencia que la tensión de oxígeno, la fase sólida y el medio líquido tienen en la diferenciación *in vitro* de los protoescólices. Como condiciones óptimas para el desarrollo *in vitro*, indicaron el empleo de una fase líquida formada por medio Parker 858 suplementado con un 20% de líquido hidatídico; una fase sólida formada por suero bovino coagulado; y una fase gaseosa constituida por 10-20% de oxígeno y 5% de CO₂. Bajo estas condiciones, la maduración de los órganos sexuales se produjo en 67 días, aunque en ningún caso se constató la fecundación. Estos datos y los de experiencias previas fueron recopilados por Smyth en 1968 y 1969.

Con objeto de mejorar el rendimiento de los cultivos, de Rycke (1968) y Wikerhauser (1969) estudiaron el efecto de varios tratamientos capaces de provocar la evaginación de los protoescólices. El porcentaje más alto de evaginación (90-95%) fue conseguido tras tratar los protoescólices durante 10 minutos con pepsina, y posteriormente durante 1-2 horas con una mezcla de tripsina y bilis. Wikerhauser (1969) observó un mayor porcentaje de evaginación en aquellos casos en que el proceso se realizó en recipientes con superficie grande (como placas Petri), en vez de en tubos de centrifuga, así como cuando se realizaba una agitación periódica. Por el contrario, el burbujeo con CO₂ redujo la evaginación. Del mismo modo, al reducir la temperatura (menor de 38°C), parte de los

protoescólices que se habían evaginado con el tratamiento se volvieron a invaginar.

Smyth & Davies (1974a) realizaron unas observaciones que tendrían una gran trascendencia en los estudios posteriores sobre este parásito: encontraron diferencias en la capacidad de desarrollo de los protoescólices, según que su origen fuera de quistes de ovinos o de equinos. Mientras que en el primer caso el desarrollo observado llegó hasta la formación de los órganos sexuales, las muestras de origen equino se mostraron siempre incapaces de desarrollarse hacia individuos segmentados, aun cuando podían mantenerse en cultivo por largos períodos de tiempo, conservando los movimientos. Consideraron que debían tratarse de variantes, o cepas, diferentes del parásito, con diferentes requerimientos fisiológicos, nutricionales o metabólicos; igualmente, también consideraron la posibilidad de que, durante el paso por la oveja, se acumule en el protoescólex un nutriente requerido para su desarrollo posterior, nutriente que falta en el caballo y que no es aportado por el medio utilizado en el sistema de cultivo (Smyth & Davies, 1974b). Esta teoría fue posteriormente desestimada.

En este mismo año, Smyth & Davies (1974c) revisaron los principales problemas que se pueden encontrar en el cultivo de las muestras de origen ovino (transporte, conservación y extracción estéril de la arena hidatídica, sistemas de cultivo, etc.). El medio considerado por estos autores como óptimo estaba constituido por un 80% de Parker 858 (suplementado con glucosa, K^+ y extracto de levadura) y un 20% de suero fetal de ternera, sobre una base sólida de suero de ternero coagulado a $76^{\circ}C$, y con una fase gaseosa constituida por un 10% de O_2 y un 5% de CO_2 . El suero fetal de ternera fue contemplado como el componente más variable del medio (tanto en capacidad de estimulación del desarrollo como en toxicidad), junto con las sales biliares. Consideraron que la no inseminación *in vitro* era más causa de defectos físicos del cultivo (densidad de organismos, presión física entre ellos, ...) que a carencias nutricionales del mismo.

Unos años más tarde, Smyth (1979a) describió con detalle las técnicas de cultivo *in vitro*, tanto de E. granulosus (de origen ovino y equino) como de E. multilocularis, así como los desarrollos alcanzados en cada caso, haciendo especial mención en los factores críticos (evaginación, suero fetal, sales biliares). Como medio de cultivo empleó Parker 858 (que puede ser sustituido por NCTC 135 o por CMRL 1066) suplementado con glucosa, extracto de levadura y suero fetal de ternera inactivado (25% del volumen final), y adicionado con una pequeña cantidad de bilis de perro o de taurocolato sódico, y antibióticos. Como condiciones de cultivo indicó una temperatura de 38.5°C (la temperatura corporal del perro) y agitación discontinua (aunque ésta no es considerada esencial). Con E. granulosus, las muestras de origen ovino alcanzaron la madurez sexual, aunque no se produjo la fecundación ni, por tanto, huevos fértiles. Las muestras de origen equino no llegaron a segmentar, aunque pudieron mantenerse por largos períodos de tiempo. Con E. multilocularis, el desarrollo era mayoritariamente monoico, apareciendo en algunos casos pseudoproglótides, con ausencia o débil formación de la membrana interproglotídea. Después de cultivos prolongados, algunos estróbilos de E. multilocularis podían desarrollar un escólex extra. De nuevo en 1981, Smyth revisó las técnicas de cultivo *in vitro* de los parásitos en general, dedicando un capítulo al cultivo de Cestodos, en donde hizo referencia al cultivo de E. granulosus y E. multilocularis. Los problemas de inseminación-fertilización planteados en dichos cultivos fueron revisados al año siguiente (Smyth, 1982a), señalando que la situación era la misma para E. granulosus y E. multilocularis, no siendo válidos en ninguno de ambos casos los sistemas de compresión desarrollados para otros cestodos (como, p.e., en Schistocephalus solidus -Smyth, 1954-) para inducir la producción de huevos fértiles *in vitro*.

Todos los datos obtenidos hasta el momento sobre las características de los cultivos y los desarrollos alcanzados por E. granulosus (cepas ovina y equina) y E. multilocularis, así como los datos obtenidos mediante otras técnicas, fueron revisados por Smyth en 1985. Como fase líquida incluyó una serie de modificacio-

nes sobre los medios descritos previamente, referentes a la incorporación de HEPES y bicarbonato sódico, como tampones.

Con posterioridad a esta revisión, Richards & Rogan (1986), cultivando protoescólices de origen equino en un medio monofásico constituido por NCTC 135 suplementado con suero fetal y antibióticos, obtuvieron individuos evaginados con conductos excretores y con una ultraestructura del tegumento formada por microtriquias totalmente desarrolladas, lo que para estos autores es signo de estrobilación, aunque ésta no progresara hasta estadios posteriores de evolución, tales como la formación de segmentos o el desarrollo del aparato genital. En base a estos resultados, sugieren que la utilización de medios difásicos no es esencial para el desarrollo estrobilar (al menos en lo que respecta al desarrollo de las estructuras tegumentales). Howell (1986) y Howell & Smyth (1995) hacen una puntualización a este respecto; considera que la existencia del sustrato sólido (junto con la evaginación previa de los protoescólices) es fundamental para el desarrollo *in vitro* de protoescólices hacia la formación de vermes adultos, aun siendo desconocidos los factores últimos que gobiernan dicho desarrollo. Sin embargo, si el cultivo se realiza a partir de vermes parcialmente desarrollados *in vivo*, el soporte sólido se ha comprobado que no es estrictamente necesario, ya que éstos llegan a madurar en cultivos monofásicos empleando sólo líquido hidatídico (aunque peor que si fuera en cultivos difásicos).

En las revisiones de Arme (1987), Smyth (1990) y Howell & Smyth (1995) se recogen los datos publicados hasta ese momento, describiéndose (con mayor detalle en la revisión de Smyth) la técnica de cultivo (manipulación y procesamiento de las muestras, medios y condiciones de cultivo, etc.), los distintos estadios de evolución, y los resultados observados hasta el momento con muestras de diferente origen (ovino, bovino, equino, caprino, humano, ...), así como los posibles desarrollos anómalos (monozoicos) observados. Smyth indica, además, la posibilidad de no emplear una fase gaseosa especial, ya que no se ha comprobado que dicha fase sea crítica u óptima para el cultivo.

Recientemente, Hijjawi *et al.* (1992a) observaron, tras 82 días de cultivo de protoescólices de origen ovino, lo que parecía el estadio inicial del desarrollo de un huevo de $19 \times 19 \mu\text{m}$, con el embrióforo formado, en un individuo monozoico/vesiculante. Son dos las posibles explicaciones sugeridas por estos autores: que espermatozoides presentes en el medio hubieran entrado por la vagina y llegado a los óvulos, fertilizándolos; o bien, que el proceso de vesiculización observado en el individuo en el que se formó el huevo hubiese provocado la rotura interna de los tejidos que separaban los espermatozoides y los óvulos, pudiéndose producir entonces la autofecundación.

Respecto a la técnica de desarrollo mixto *in vivo-in vitro*, a partir de los experimentos de Smyth & Howkins (1966) (citados en la revisión de Smyth, 1969), ésta fue estandarizada por Kumaratilake & Thompson (1981). Realizaron un desarrollo previo del parásito en el perro, hasta los 35 días post-infestación (la fertilización se produce a los 25-30 días), en que fueron transferidos a cultivos *in vitro*, en donde obtuvieron, a los 40-45 días, huevos embrionados en el último segmento; el número de huevos producido en cada segmento varió de 18 a 600, con una media de 200. El medio líquido estuvo constituido por Parker 199 suplementado con suero fetal de ternera, ClK, glucosa, aminoácidos y antibióticos. Aplicando esta misma técnica, Singh & Dhar (1987), con protoescólices procedentes de quistes de búfalos de la India, han obtenido un 40% de huevos embrionados, a los 60 días. Con *E. multilocularis*, Thompson & Eckert (1982) obtuvieron huevos embrionados en 28-30 días, aunque en menor cantidad que *in vivo*. Estos resultados y la descripción de la técnica vienen recogidos en las revisiones de Howell (1986), Arme (1987) y Smyth (1990).

Una posible alternativa a estos desarrollos mixtos es la que han desarrollado Kamiya y colaboradores, trabajando primero con *Taenia crassiceps* (Sato & Kamiya, 1989a, b, 1990; Kitaoka *et al.*, 1990), y después con *E. multilocularis* (Kamiya & Sato, 1990a, b), habiendo conseguido el desarrollo completo del adulto (hasta la formación de huevos viables y su liberación del hospedador) en el

intestino delgado de roedores (Mesocricetus auratus, Meriones unguiculatus), mediante el empleo de prednisolona durante el período de desarrollo del parásito.

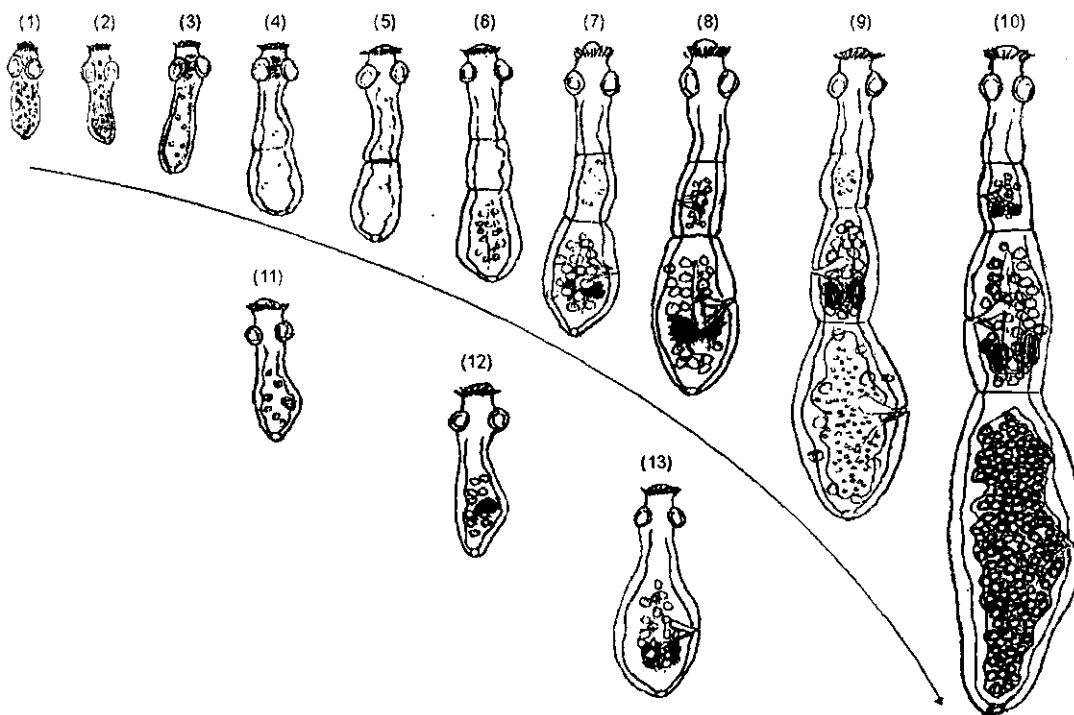
2.3.1.3.2. Secuencias de desarrollo observadas

El desarrollo normal del parásito en perros ha sido descrito, entre otros, por Smyth *et al.* (1967), Smyth & Davies (1974a), Smyth (1977, 1979a, 1982b), Thompson (1977) y Clarkson & Walters (1991) (Figura 8, estadios 1-10); en condiciones *in vitro*, dicho desarrollo ha sido descrito por Smyth & Davies (1974c), Smyth (1979) y Macpherson & Smyth (1985) (Figura 8, estadios 1-9); Marchiondo & Andersen (1984) han descrito, a microscopía óptica y electrónica, el proceso de evaginación (*in vitro*) de los protoescolices de E. multilocularis. En condiciones *in vitro*, el desarrollo es similar al observado en perros, aunque tardándose algo más en alcanzar los distintos estadios evolutivos, y sin llegar a la formación de huevos viables.

En el curso de una serie de experimentos, Smyth (1971) observó el desarrollo anormal que algunos individuos presentaron, consistente en el no desarrollo de segmentación aparente, pero sí de los órganos sexuales (Figura 8, estadios 11-13). A estos individuos se les dio el nombre de monozoicos. Se consideró que este desarrollo correspondería a individuos mutantes, o bien a condiciones experimentales anormales (aunque la mayoría de los individuos del mismo cultivo segmentaron normalmente). El fenómeno del desarrollo monozoico en E. granulosus fue más tarde revisado por Smyth (1975; publicado en 1978), y observado por otros autores (Hijawi *et al.*, 1992a). Sin embargo, este hecho, que en cultivos de E. granulosus parece una excepción, se ha mostrado relativamente común en E. multilocularis, como comprobaron Smyth & Davies (1975), quienes obtuvieron un 70-80% de formas monozoicas. Hay que señalar que el cultivo de E. multilocularis fue monofásico, mientras que el de E. granulosus fue difásico. Posteriormente, Smyth & Barrett (1979) explicaron con mayor detalle las

fases iniciales del desarrollo monoico de E. multilocularis, observando el alargamiento de los protoescólices y el desarrollo de dos o más juegos de órganos genitales, formando estróbilos pseudo-segmentados; Thompson *et al.* (1990) describieron el desarrollo de algunos individuos hasta la formación de un segmento y maduración parcial (comienzo de la formación de los órganos sexuales) del mismo, degenerando dichos individuos poco después.

Figura 8 - Estadios evolutivos observados en los desarrollos estrobilares (según Smyth, 1979; Smyth & Barrett, 1979; Kumaratilake *et al.*, 1983).



Desarrollo estrobilar normal:

- 1 - Estadio inicial
- 2 - Formación de canales y vesícula excretora
- 3 - Pérdida de corpúsculos calcáreos
- 4 - Presegmentación (bandeo)
- 5 - Formación del primer segmento
- 6 - Formación del segundo segmento
- 7 - Desarrollo de los testículos
- 8 - Aparición del poro genital

9 - Útero desarrollado

10 - Huevos desarrollados

Desarrollo monoico:

- 11 - Formación de embriones testiculares
- 12 - Desarrollo de los testículos y esbozos de la genitalia femenina
- 13 - Formación del poro genital.

2.3.2. DESARROLLOS VESICULARES *IN VIVO*

2.3.2.1. Modelos de laboratorio

Dada la impracticabilidad de estudiar en laboratorio la fase larvaria de E. granulosus en los hospedadores naturales (por las necesidades de espacio y los costos asociados al mantenimiento de herbívoros de gran tamaño), se han desarrollado técnicas que permiten el establecimiento de los quistes en animales pequeños y de fácil mantenimiento (normalmente, en ratones); no obstante, en ocasiones se han empleado como modelos experimentales animales de mayor tamaño, como papiones y macacos (Hutchinson, 1966; Macpherson *et al.*, 1986), a veces sin éxito (Thompson & Smyth, 1976). En general, las distintas experiencias realizadas se pueden agrupar en dos modelos:

- hidatidosis primaria experimental: la infestación se lleva a cabo por inoculación oral, intravenosa o intraperitoneal de huevos o de oncosferas activadas;
- hidatidosis secundaria experimental: se realizan infestaciones similares a las producidas por la rotura de un quiste en el hospedador natural, mediante inoculación intraperitoneal de protoescolices (obtenidos en infestaciones naturales o experimentales), o por trasplante de los quistes obtenidos en otros desarrollos primarios o secundarios, a hospedadores homólogos o heterólogos.

2.3.2.1.1. Hidatidosis primaria experimental

El principal problema de realizar infestaciones primarias es su peligro, debido al empleo de material biológico (huevos) infestantes para el hombre. Además, los resultados obtenidos han sido variables: mientras que los simios, infestados a partir de proglótides grávidas de E. granulosus, se han mostrado

válidos para este tipo de experiencias (Hutchinson, 1966; Macpherson *et al.*, 1986), con roedores (principalmente ratones), infestados con huevos, oncosferas o anillos grávidos de E. granulosus o de E. multilocularis, algunos autores no han obtenido desarrollos larvarios (Rausch & Schiller, 1956; Sadun *et al.*, 1957; Sweatman & Williams, 1963; Gill & Rao, 1967), siendo considerados por Yamashita (1968) como normalmente resistentes a la infestación oral. Sin embargo, son más los autores que han obtenido resultados positivos (Devé, 1911; Vogel, 1955; Mankau, 1956; Yamashita *et al.*, 1956; Batham, 1957; Webster & Cameron, 1961; Heath, 1970; Williams & Colli, 1970; Colli & Williams, 1972; Colli & Schantz, 1974; Torres & Wisnevesky, 1978; Euzèby *et al.*, 1982), habiéndose desarrollado un modelo experimental primario murino para su uso en estudios de vacunación (Dempster *et al.*, 1991).

2.3.2.1.2. Hidatidosis secundaria experimental (H.S.E.)

La inoculación intraperitoneal de protoscolexes se ha mostrado como un buen modelo experimental para el desarrollo larvario del parásito, con la ventaja añadida de ser una técnica sencilla y sin riesgos. La utilidad de este modelo se ha puesto de manifiesto en los numerosos estudios de desarrollo, bioquímicos, inmunológicos, quimioterápicos y de ensayo de viabilidad de muestras que se han realizado (ver Thompson, 1986; Thompson & Allsopp, 1988).

En el modelo de H.S.E., la fuente de material parasitario (protoescolexes) son los quistes desarrollados de forma natural en los hospedadores intermedios. Sin embargo, sería también posible infestar animales de laboratorio con protoescolexes obtenidos en desarrollos experimentales (H.S.E. seriada). De esta manera se podría en parte paliar la falta de material parasitario natural, disponiendo de forma continua de animales infestados con los que realizar experiencias de diversos tipos (Schwabe *et al.*, 1970). Este proceso de mantenimiento es rutinario con E. multilocularis (Eckert *et al.*, 1983), pero difícil de mantener en el

caso de E. granulosus, debido al lento desarrollo del parásito y al escaso número de quistes fértiles, y de protoescólices por quiste, que se desarrollan en los modelos experimentales. No obstante, Schwabe *et al.* (1964, 1970), Schwabe & Yamashita (1968), Heath (1970) y de Rycke & Pennoit-de Cooman (1978) han podido realizar pases seriados durante una o varias generaciones, aunque observando grandes variaciones en la tasa de crecimiento, en el tamaño de los quistes fértiles, y en el tiempo necesario para obtenerlos.

Debido a la dificultad en mantener la fase larvaria de E. granulosus de forma seriada, diversos autores han pretendido soslayar el problema mediante el trasplante de quistes entre hospedadores experimentales homólogos o heterólogos (Schwabe *et al.*, 1964, 1970; Varela-Díaz *et al.*, 1974; Reisin *et al.*, 1977; Connor, 1980; Cuesta Bandera & Martínez Fernández, 1984c). Esta misma técnica de implantación quirúrgica de quistes previamente desarrollados ha sido utilizada por Morris & Taylor (1990) para determinar la efectividad de un tratamiento previo *in vivo*, y por Casado Escribano *et al.* (1992) para comprobar la viabilidad de quistes obtenidos *in vitro* tras 90 días de cultivo, obteniendo estos últimos resultados satisfactorios.

2.3.2.2. Animales de experimentación

Ciñéndonos sólo al modelo de H.S.E., los primeros estudios fueron debidos a Devé (1933a, b, 1934), quien encontró que los ratones (Mus musculus) son susceptibles a la infestación por inoculación intraperitoneal de protoescólices de E. granulosus. Estudios posteriores llevados a cabo por de Cooman (1937), de Waele & de Cooman (1938) y Coutelen *et al.* (1939) confirmaron la validez del modelo murino; los gerbillos (Meriones unguiculatus) se han mostrado también como hospedadores experimentales válidos (Kammerer & Pérez-Esandi, 1975; Thompson, 1976a,b; Morris & Taylor, 1990); otras especies animales ensayadas

resultaron menos adecuadas experimentalmente (Heath, 1970; Pandey, 1972). Con E. multilocularis, ratones, ratas del algodón (Sigmodon hispidus) y cricetos pueden ser también empleados (Campbell *et al.*, 1975; Ali-Khan & Siboo, 1980; Eckert *et al.*, 1983).

Dentro del modelo murino hay que tener en cuenta la edad, el sexo y la estirpe de los ratones, ya que se han observado diferencias en los desarrollos larvarios en función de dichos factores. Respecto a la edad, en la mayoría de los trabajos se han empleado animales jóvenes (de 3-6 semanas); Schwabe *et al.* (1959) encontraron que los animales más susceptibles fueron los de menos de 45 días, atribuyendo la mayor resistencia observada en los animales más viejos a una respuesta celular más intensa, y quizá también al desarrollo de la madurez sexual.

No hay acuerdo sobre la existencia de diferencias en el desarrollo quístico en función del sexo del ratón; en general, suelen emplearse hembras, sobre todo en las experiencias a largo plazo (varios meses), ya que las condiciones de supervivencia son mejores (las hembras son menos belicosas). En los distintos trabajos publicados se han utilizado tanto machos (Pennoit-de Cooman & de Rycke, 1970; Hurd *et al.*, 1993) como hembras (Kammerer & Pérez-Esandi, 1975; Kammerer & Judge, 1976; de Rycke & Pennoit-de Cooman, 1978; Kammerer & Miller, 1981; Gemmell & Parmeter, 1983; Cuesta Bandera & Martínez Fernández, 1984a; Bessonov & Yastreb, 1991; Janssen *et al.*, 1992), o ambos sexos a la vez (Thompson, 1976b; Connor, 1980), con resultados satisfactorios; Smyth & Barrett (1980) describieron un protocolo de comprobación de la viabilidad de quistes humanos operados en un modelo murino, sin hacer especial mención del sexo de los ratones. Sin embargo, Frayha *et al.* (1971) observaron que los machos fueron más susceptibles a la infestación que las hembras, y que las hormonas femeninas (estradiol) disminuyeron la susceptibilidad de los animales con ellas tratados.

La estirpe de ratones empleada también puede tener influencia sobre el desarrollo del parásito. En muchas ocasiones los distintos estudios se han realizado sobre la estirpe disponible en cada caso (p.e., Schwabe *et al.*, 1959, indican que los ratones empleados por ellos "... fueron de una cepa que fue obtenida de la Unidad Médica ... de las Fuerzas Navales americanas en El Cairo en 1952."). Las estirpes más empleadas han sido la BALB/c y NMRI, y, en menor medida, AKR, AZ, CD1, CF1, CFHB, NIH, TF1, y otras. Pennoit-de Cooman & de Rycke (1970) y Cuesta Bandera & Martínez Fernández (1982) no encontraron diferencias significativas, a nivel de desarrollo quístico, entre las distintas estirpes por ellos empleadas. Sin embargo, Yamashita *et al.* (1958), con E. multilocularis, y Dempster *et al.* (1991), en infestaciones primarias con E. granulosus, obtuvieron diferencias en la susceptibilidad a la infestación; estos últimos autores consideraron que dichas diferencias eran debidas, entre otros motivos, a las características genéticas de las distintas estirpes murinas, mostrándose más susceptibles aquellas estirpes con deficiencias en el sistema del complemento.

2.3.2.3. Condiciones del inóculo

Para la realización de las inoculaciones se han empleado protoescólices libres, o arena hidatídica; las membranas quísticas, en el caso de E. granulosus, no sirven para desarrollos quísticos (Sweatman *et al.*, 1963; Riley *et al.*, 1989), aunque sí pueden emplearse, en trasplantes o a modo de homogeneizados, en E. multilocularis (Eckert *et al.*, 1983; Kamiya *et al.*, 1987; Novak, 1990; Liance *et al.*, 1992).

Las condiciones del inóculo no han sido en general estrictamente definidas, limitándose, en la mayoría de los casos, a señalar la cantidad de protoescólices inoculados en cada animal, a veces de forma imprecisa (indicando el volumen de suspensión de protoescólices, sin dar más datos); en algunos trabajos ni

quiera este punto se indica. Sin embargo, éste es un dato importante, ya que el éxito del desarrollo experimental está condicionado, en buena parte, por el número de organismos (huevos, oncosferas, protoescólices) inoculados (Pauluzzi & de Rosa, 1969; Pennoit-de Cooman & de Rycke, 1970; Pennoit-de Cooman *et al.*, 1974; Colli & Schantz, 1974, 1975). En ratones, el inóculo ha variado desde unos 100 (Heath, 1970; Pennoit-de Cooman & de Rycke, 1970) hasta 25.000 protoescólices/animal (Heath, 1970), siendo lo normal dosis de en torno a los 1.000-4.000 protoescólices (Kammerer & Pérez-Esandi, 1975; Kammerer & Judge, 1976; Thompson, 1976b; de Rycke & Pennoit-de Cooman, 1978; Connor, 1980; Kammerer & Miller, 1981; Cuesta Bandera & Martínez Fernández, 1982, 1984a; Marshall & Edwards, 1982; Kumaratilake & Thompson, 1983; Morris & Taylor, 1990; Bessonov & Yastreba, 1991; Janssen *et al.*, 1992; Hurd *et al.*, 1993; entre otros). En gerbillos ha sido de 1.000 (Schwabe *et al.*, 1970; Kammerer & Pérez-Esandi, 1975) a 8.000 protoescólices (Thompson, 1976a, b); en otras especies ha estado en función del tamaño del animal, pudiendo llegar a ser de hasta un millón de protoescólices (Heath, 1970, en ovejas).

El método de inoculación ha sido por inyección intraperitoneal (en ocasiones, inyección subcutánea -Pennoit-de Cooman & de Rycke, 1970-) de una suspensión de protoescólices en diversas soluciones, principalmente solución de Hank (p.e., Pennoit-de Cooman & de Rycke, 1970; Thompson, 1976b; Kumaratilake & Thompson, 1983; Bessonov & Yastreba, 1991; Hurd *et al.*, 1993) y solución de Ringer (entre otros, Pennoit-de Cooman & de Rycke, 1970; Kammerer & Pérez-Esandi, 1975; Janssen *et al.*, 1992); también se ha empleado como vehículo líquido hidatídico (Cuesta Bandera & Martínez Fernández, 1982, 1984a,c), solución salina (Frayha *et al.*, 1971; Thompson, 1976a) y medio de cultivo (Marshall & Edwards, 1982). En algunos casos se han añadido antibióticos (penicilina y/o estreptomicina) (Webster & Cameron, 1961; Frayha *et al.*, 1971; Kammerer & Pérez-Esandi, 1975; Thompson, 1976a,b; Cuesta Bandera & Martínez Fernández, 1982, 1984a,c) y EDTA (Cuesta Bandera & Martínez Fernández,

1982, 1984a,c) (como agente anticomplementario, para disminuir la lisis inicial de protoescólices).

2.3.2.4. Desarrollo experimental observado

Son varios los estudios realizados sobre la evolución de la hidatidosis experimental (primaria y secundaria) en sus diferentes períodos, desde los primeros días post-infestación hasta los 4 -15 meses, tanto a nivel morfológico como inmunológico (Schwabe *et al.*, 1959; Gill & Rao, 1967; Pauluzzi, 1969; Heath, 1970; Pennoit-de Cooman & de Rycke, 1970; de Rycke & Pennoit-de Cooman, 1971; Colli & Schantz, 1974; Thompson, 1976b; Araj *et al.*, 1977a,b; Cuesta Bandera & Martínez Fernández, 1982, 1984a,b,c,d; Rogan & Richards, 1989); las diferencias encontradas se relacionan, principalmente, con los tiempos necesarios para el desarrollo de quistes fértiles (cápsulas prolíferas y protoescólices), criterio que ha sido, y es, utilizado para considerar que el período de formación de la larva ha terminado. En el caso de las infestaciones primarias, Colli & Schantz (1974) observaron quistes fértiles a los 6 meses, mientras que en infestaciones secundarias, los desarrollos más rápidos fueron obtenidos por Heath (1970) y Connor (1980), en 8 y 7 meses, respectivamente.

El proceso de desarrollo quístico en el modelo murino puede básicamente -dividirse en varias fases (a partir de Heath, 1970; Cuesta Bandera & Martínez Fernández, 1982, 1984d):

- diferenciación de los protoescólices hacia formas vacuolizadas/vesiculadas, mediante un proceso similar al observado *in vitro*;
- formación de la membrana laminar (formación de microquistes);
- crecimiento del quiste; y
- desarrollo de cápsulas prolíferas y protoescólices a partir de la membrana germinal del quiste.

Durante los primeros días de la infestación es cuando se produce el mayor número de muertes entre los protoescólices inoculados, debido a la respuesta inmune celular del hospedador (este hecho ha sido también observado en infestaciones con oncosferas). Al cabo de una semana pueden observarse tanto protoescólices libres como pequeños granulomas blancos, libres en la cavidad abdominal o fijados a la superficie del hígado (ocasionalmente, del bazo, diafragma, mesenterio, u otros órganos), formadas por protoescólices (vivos y muertos) rodeados por fibroblastos y macrófagos. A las dos semanas post-inoculación ya no aparecen protoescólices libres; los vivos que se encuentran dentro de los granulomas empiezan ya a sufrir un proceso de vesiculización similar al observado *in vitro*. A los 25 días ya pueden distinguirse microquistes formados, con una membrana laminar patente; a los 40-50 días pueden llegar a apreciarse quistes individuales a simple vista. Los ganchos del roseto son absorbidos o son incluidos en la membrana laminar a los 2-4 meses de desarrollo. Los quistes van aumentando en tamaño, presentándose aislados o agrupados en racimos, en ambos casos tanto libres en la cavidad peritoneal como fijados a algún órgano interno. A partir de los 7-8 meses se pueden encontrar ya quistes fértiles desarrollados, con un tamaño que puede llegar hasta los 30 mm. en ratones (Heath, 1970) y 35 mm. en gerbillos (Thompson, 1976b). No siempre son los quistes más grandes los que son fértiles (Sweatman & Williams, 1963; Heath, 1970; Colli & Schantz, 1974; Thompson, 1976b), pudiendo estar la fertilidad relacionada con el contenido en agua del quiste (Heath, 1970).

La localización de los quistes desarrollados a partir de protoescólices es variable, pudiendo estar en prácticamente cualquier órgano de la cavidad abdominal, el diafragma e incluso la cavidad torácica; en las inoculaciones subcutáneas, los quistes se han encontrado mayoritariamente en la zona de inoculación (Pennoit-de Cooman & de Rycke, 1970). En las inoculaciones de oncosferas, hígado y pulmón son los órganos más parasitados (Colli & Schantz, 1974).

Es característico, en el modelo de H.S.E., que sólo unos pocos protoescolices, de todos los inoculados, evolucionen a quistes. Como posibles explicaciones de este hecho hay factores dependientes de los propios protoescolices (edad, vitalidad, condiciones de mantenimiento -Pennoit-de Cooman & de Rycke, 1970-, etc.) y del hospedador (edad -Schwabe *et al.*, 1959-, intensidad de la respuesta inmune -Cuesta Bandera & Martínez Fernández, 1982-, etc.). La intensidad de la respuesta inmune puede ser variable durante las fases iniciales de desarrollo, en función del número y tamaño de los quistes desarrollados (Pauluzzi, 1969; Araj *et al.*, 1977a,b) y de la estirpe de ratones empleada (Cuesta & Martínez, 1982), pero no se han observado diferencias en las fases finales en relación con el desarrollo de la fertilidad en algunos quistes (Cuesta Bandera & Martínez Fernández, 1984d).

2.3.3. ANÁLISIS MORFOMÉTRICOS

2.3.3.1. Los estudios morfológicos en la sistemática de Echinococcus

La morfología ha sido el criterio más empleado en los estudios de caracterización y clasificación dentro de Echinococcus (revisado por Kumaratilake & Thompson, 1982a), debido a que ha sido, y es, universalmente aceptada para determinaciones taxonómicas, y éste ha sido hasta hace poco el principal motivo para realizar estudios comparativos en este parásito. Las diferentes especies y/o subespecies descritas en Echinococcus fueron diferenciadas considerando principalmente individuos adultos obtenidos de hospedadores domésticos o silvestres. Dado que, en general, los distintos autores dieron demasiada importancia al hospedador de origen, a la localización geográfica, o a pequeñas diferencias morfológicas, la mayoría de dichas especies y subespecies fueron posteriormente invalidadas (revisado por Kumaratilake & Thompson, 1982a; Thompson &

Lymbery, 1988; Thompson *et al.*, 1994). Esta multiplicidad en el número de especies descritas no es mas que un reflejo de la variabilidad y complejidad del proceso de especiación de Echinococcus, ya mencionado por diversos autores (Smyth & Smyth, 1964; Smyth, 1977; Thompson, 1978, 1979, 1986, 1995).

Mientras que la morfología puede permitir reconocer las distintas especies del género, no hay acuerdo sobre la validez de la misma para caracterizar las variantes intraespecíficas de este cestodo (Rausch, 1953; Vogel, 1957; Sweatman & Williams, 1963; Rausch & Nelson, 1963; Verster, 1965; Kumaratilake & Thompson, 1982a; Hobbs *et al.*, 1990). Son varios los factores que han conducido a este desacuerdo (Rausch, 1953, 1967; Thompson, 1979); con frecuencia, son demasiado pocos los caracteres o especímenes analizados, o bien son los diferentes métodos de fijación los que producen diferencias entre los individuos. Además, no se han realizado estudios específicos sobre el rango de variación de los caracteres normalmente empleados en análisis morfológicos (puede haber diferencias estadísticamente demostrables, pero taxonómicamente insignificantes -Rausch, 1967-), o sobre la covariación entre diferentes caracteres, que permitiría eliminar redundancias. Tampoco se han realizado estudios sobre la heredabilidad de los caracteres morfológicos, aunque hay evidencia de que algunos caracteres son significativamente afectados por el hospedador (Smyth & Smyth, 1968; Schantz *et al.*, 1975, 1976; Thompson, 1979; Hobbs *et al.*, 1990). Sin un análisis de los componentes genéticos y ambientales de variación, las diferencias morfológicas pueden no proporcionar *per se* una estimación satisfactoria de las diferencias genéticas entre las distintas poblaciones de Echinococcus; sin embargo, si dichas diferencias morfológicas son validadas por los resultados obtenidos con otras técnicas, entonces sí pueden ser criterios diagnósticos para identificar dichas poblaciones (ver Thompson, 1986, 1995).

2.3.3.2. Caracteres morfológicos empleados en la diferenciación de cepas de Echinococcus granulosus. Tamaño de la muestra y tratamiento estadístico

Una vez aceptada la existencia de cepas dentro de E. granulosus, se empezaron a realizar diversos trabajos sobre la caracterización, a distintos niveles, de las mismas. A nivel morfológico, estos estudios se realizaron sobre adultos y, principalmente, sobre protoescólices, ya que, si bien el rango de hospedadores definitivos es pequeño, pudiéndose desarrollar todas las posibles cepas domésticas en una misma especie de hospedador definitivo (perro), el amplio rango de hospedadores intermediarios podría ser debido a una capacidad de infestación diferencial de las distintas cepas, pudiendo ser éste, entonces, un criterio de identificación (ya utilizado por algunos autores para diferenciar subespecies). Además, la facilidad de obtención y la seguridad en el manejo son dos factores a favor de la realización de los diferentes estudios sobre protoescólices en vez de sobre adultos.

Los mismos caracteres empleados para la diferenciación específica o subespecífica dentro del género han sido empleados también para la caracterización de las posibles cepas existentes. Como ya se ha indicado en el apartado correspondiente a los estudios morfológicos relativos a la caracterización de cepas, (apartado 2.2.3.3.), los caracteres analizados en los adultos han sido la morfología externa (longitud total; número de anillos, desarrollo y dimensiones de los mismos; número de coronas de ganchos del rostelo, y número, forma, disposición y longitud -total y de la hoja- de éstos) y las características del aparato reproductor (posición y dimensiones de la bolsa del cirro; número, diámetro y posición de los testículos; forma, posición y dimensiones del ovario; y número de huevos por anillo, y dimensiones de los mismos). Con respecto a la fase larvaria, se han considerado las características del rostelo de los protoescólices (número, forma, disposición y longitud -total y de la hoja- de los ganchos).

No se ha seguido, en los distintos trabajos realizados, un criterio uniforme a la hora de determinar el número mínimo de muestras a analizar. En la mayoría de los casos, la diferente cantidad de muestras de uno u otro origen estudiadas ha sido un reflejo de la facilidad de obtención de las mismas, siendo las ovinas y equinas, por tanto, las más estudiadas. El número de muestras analizadas procedentes de otros hospedadores sólo ha sido elevado en trabajos específicos sobre las mismas.

Respecto al número de individuos (protoescólices o adultos) a considerar en cada muestra, se ha seguido mayoritariamente el criterio indicado por Kumaratilake & Thompson (1984a), en ocasiones con pequeñas variaciones: 30 individuos, para el número de ganchos; 10 individuos, para las longitudes (de la hoja y total) de los mismos, midiéndose en este caso dos ganchos grandes y dos pequeños por rostelo; y 20 individuos, para el resto de los caracteres (longitud total y del estróbilo del adulto, morfología del aparato reproductor). Otros autores indican que el análisis se realizó sobre un mínimo de individuos, sin especificar más (p.e. Said *et al.*, 1988), o indican la cantidad total de protoescólices considerados a partir de varios quistes (p.e., Williams & Sweatman, 1963; Sweatman & Williams, 1963; Gill & Rao, 1967; Pandey, 1972).

El tratamiento estadístico de los datos obtenidos ha consistido, normalmente, en la realización de análisis de la varianza, para determinar la existencia de diferencias significativas entre muestras o grupos de muestras, y, en caso de existir dichas diferencias, en la realización de la prueba de la *t* de Student para determinar la muestra, o muestras, diferentes (Kumaratilake & Thompson, 1984a; Kumaratilake *et al.*, 1986; Eckert *et al.*, 1989). Algunos autores han realizado únicamente la prueba de la *t* de Student (Thompson *et al.*, 1984; Said *et al.*, 1988), o bien han empleado técnicas de análisis de clusters (Eckert *et al.*, 1993).

2.3.4. PERFILES PROTEICOS Y ANTIGÉNICOS

2.3.4.1. Perfiles proteicos

Aparte de la composición de los ganchos del escólex, poco se sabe sobre las proteínas estructurales de E. granulosus (revisado por McManus & Bryant, 1995). Sin embargo, las proteínas solubles han recibido mucha mayor atención, debido a que su estudio facilita la identificación y caracterización de antígenos específicos para diagnóstico serológico, y para el estudio de la respuesta inmune en hidatidosis. No obstante, es poca la información sobre la naturaleza exacta de dichas proteínas, siendo en su mayoría referida sólo al estado quístico.

La composición química del líquido hidatídico, protoescólices y/o membrana germinal ha sido estudiada por muchos investigadores (Sánchez Franco & Sánchez Acedo, 1971; Frayha & Haddad, 1980; McManus, 1981; Anguiano, 1984; Chowdhury *et al.*, 1986; Hurd, 1989; Sultan *et al.*, 1989; Gatne *et al.*, 1990; Janssen *et al.*, 1991; Anwar *et al.*, 1993; entre otros). Formando parte del líquido hidatídico se han encontrado también proteínas del hospedador, principalmente albúmina y diferentes clases de inmunoglobulinas (IgG e IgM) (Graetz, 1912; Van der Holden, 1924; Kellaway, 1928; Bensted & Atkinson, 1953; Kagan *et al.*, 1960; Chordi & Kagan, 1965; Kagan & Agosin, 1968; Coltorti & Varela-Díaz, 1974, 1975; Hustead & Williams, 1977; Edwards, 1982; Sheperd & McManus, 1987b; Shapiro *et al.*, 1992). La forma en que dichas proteínas pueden entrar en el quiste no está clara; para Coltorti & Varela-Díaz (1975), entran por fisuras en las membranas quísticas, mientras que para Hustead & Williams (1977) es debido a períodos cíclicos de absorción de sustancias, seguidos de una rápida degradación de las mismas.

Los análisis de los perfiles proteicos, isoenzimáticos y antigénicos en E. granulosus, a partir de líquidos hidatídicos, protoescólices y/o membranas germi-

nales, empezaron a realizarse en los años '70, a raíz del descubrimiento de la existencia de cepas en este parásito, habiéndose probado, en general, como un buen criterio de diferenciación intraespecífica.

La separación de las proteínas puede hacerse en base a su carga o a su tamaño (peso molecular). En el primer caso se ha empleado la técnica del isoelectroenfoque; en el segundo, los distintos investigadores han realizado electroforesis (SDS-PAGE) en geles homogéneos o de diferente gradiente.

Respecto al isoelectroenfoque, los primeros investigadores en aplicar esta técnica al estudio de cepas en Echinococcus fueron Lee, Thompson y Davies (citados por Smyth, 1977). Kumaratilake & Thompson (1979) estandarizaron esta técnica para el estudio de proteínas solubles, con vistas a posteriores estudios de especiación en E. granulosus, siendo aplicada de dicha forma por Kumaratilake *et al.* (1979) y Kumaratilake & Thompson (1984b). Le Riche & Sewell (1978), McManus & Smyth (1979) y Macpherson & McManus (1982) emplearon el isoelectroenfoque para el estudio de isoenzimas. Sin embargo, los problemas de esta técnica (revisados por An der Lan & Chrambach, 1981) hicieron que, en los estudios en Echinococcus, fuera abandonada, en favor del SDS-PAGE (para estudios de proteínas) o de los geles de almidón (para estudios de isoenzimas).

La técnica de SDS-PAGE fue descrita por Laemmli (1970), siendo posteriormente revisada por Hames (1981), quien aconseja el empleo de un sistema discontinuo con SDS, debido a su alta capacidad de resolución. Aunque otros autores han descrito variantes de dicha técnica, Hames considera que es el sistema de Laemmli el de mayor poder de resolución, especialmente en mezclas complejas de proteínas.

El análisis de proteínas mediante SDS-PAGE se ha probado, en general, como un buen criterio de diferenciación intraespecífica, aunque ha sido empleado por pocos investigadores. Esta técnica se ha aplicado al análisis de proteínas de

E/S (presentes en los líquidos hidatídicos) (Gatne *et al.*, 1990; Siles Lucas & Cuesta Bandera, 1990; Singh *et al.*, 1992; Siles Lucas, 1993) y somáticas (Zvolinskene & Sruoga, 1976; McManus & Barrett, 1985; Janssen *et al.*, 1990; Siles Lucas & Cuesta Bandera, 1991b; Siles Lucas, 1993). Las condiciones de la prueba (sistema continuo -gel único- o discontinuo -gel de concentración sobre gel de resolución-) y las características del gel (homogéneo o en gradiente) han variado según los autores; no obstante, Hames (1981) considera que, en general, el sistema discontinuo permite una mejor separación (por tanto, una mejor resolución) entre las proteínas de las muestras. En nuestro laboratorio, los mejores resultados se han obtenido en sistemas discontinuos, con un gradiente de concentraciones 5-20% en el gel de resolución (Siles Lucas & Cuesta Bandera, 1990a,b; Siles Lucas, 1993).

Janssen *et al.* (1990) y Siles Lucas (1993) consideran que el estudio de los perfiles proteicos obtenidos en el análisis de extractos totales de protoescolices no es un buen criterio para aplicar a los estudios de identificación y caracterización de cepas de E. granulosus, debido a la complejidad de los patrones y a las prácticamente nulas diferencias observadas; el estudio de extractos proteicos parciales parece ser más adecuado, a la vista de los resultados obtenidos por McManus & Barrett (1985) (Siles Lucas, 1993).

Sin embargo, los resultados obtenidos en los análisis de los perfiles de proteínas de E/S (líquidos hidatídicos) han sido mucho mejores (Gatne *et al.*, 1990; Siles Lucas & Cuesta Bandera, 1990; Singh *et al.*, 1992; Siles Lucas, 1993). A este respecto, y teniendo en cuenta la posibilidad (demostrada) de que existan proteínas del hospedador presentes como contaminantes en los líquidos hidatídicos, Siles Lucas (1993) considera como un paso necesario y crítico la purificación previa de las muestras, para eliminar dichos contaminantes.

El revelado de los geles puede realizarse con negro amido, azul de Coomasie, o con plata. El negro amido es menos sensible que el azul de Cooma-

sie (Hames, 1981), por lo que no se utiliza. La tinción con plata, aunque es hasta 100 veces más sensible que la realizada con azul de Coomasie, puede presentar variaciones en el grado de tinción, según la proteína teñida (Hames, 1981); por otro lado, la mayor complejidad del proceso de tinción respecto al azul de Coomasie, y la obtención de resultados bastante similares entre ambos tipos de tinción, hacen que sea el azul de Coomasie el colorante normalmente empleado en el revelado de los geles (Siles Lucas, comunicación personal).

2.3.4.2. Perfiles antigénicos

Son pocos los estudios realizados sobre caracterización y diferenciación antigénica de cepas de E. granulosus; la mayoría de los trabajos sobre antígenos de Echinococcus han tenido como objetivo identificar y/o caracterizar antígenos que pudieran ser importantes para el diagnóstico de la parasitosis o para el desarrollo de potenciales vacunas (revisado por Lightowlers & Gottstein, 1995).

La identificación de proteínas antigénicas fue inicialmente realizada por IEF (ver Lightowlers & Gottstein, 1995), siendo esta técnica aplicada a la caracterización de muestras de diferente origen por Guisantes (1979) en España (muestras ovinas, bovinas y suinas), y por Pezzella *et al.* (1984) en Italia (muestras ovinas, bovinas y humanas). Sin embargo, en 1984, Lingelbach & Hinz pusieron a punto la técnica de inmunoblot para estudio de proteínas parasitarias (de E. multilocularis) con capacidad antigénica. Se trata de una modificación del Western blotting (técnica desarrollada por Towbin *et al.*, 1979, y Burnette, 1981, consistente en la separación de proteínas en geles de acrilamida y posterior transferencia a papel de nitrocelulosa), en la que el revelado de las proteínas antigénicas se realiza mediante incubación con sueros positivos (inmunes o hiperinmunes) y posterior incubación con conjugados marcados enzimáticamente (con peroxidasa). Hausi & Bueker (1986) introdujeron pequeñas modificaciones (relativas a la solución de bloqueo) para mejorar la técnica.

Los inmunoblots han sido y son muy utilizados con E. granulosus en estudios de identificación y caracterización de antígenos en/para diagnósticos serológicos (Sheperd & McManus, 1987a,b; Lightowlers *et al.*, 1989; Maddison *et al.*, 1989; Siracusano *et al.*, 1991; Kanwar *et al.*, 1992; Leggatt *et al.*, 1992; Shapiro *et al.*, 1992; entre otros). También se han empleado en estudios comparativos, para determinar qué origen quístico (=hospedador de procedencia) es el más apropiado como fuente de antígenos para pruebas de diagnóstico (Gottstein *et al.*, 1987), o para comparar la eficacia de varias técnicas de purificación de líquidos hidatídicos (Queralt *et al.*, 1989). Sin embargo, son pocos los estudios en que se han empleado inmunoblots para caracterizar y diferenciar cepas de E. granulosus (Janssen *et al.*, 1990; Siles Lucas & Cuesta Bandera, 1991a, 1993; Siles Lucas, 1993).

En estos trabajos, los inmunoblots se realizaron según el protocolo de Lingelbach & Hinz (1984), empleando como suero inmune el obtenido de conejos inoculados con extractos proteicos de protoescólices (caso de Janssen *et al.*, 1990) o con líquidos hidatídicos purificados y concentrados (Siles Lucas & Cuesta Bandera, 1991a, 1993; Siles Lucas, 1993). Tanto con sueros homólogos como heterólogos (los primeros no empleados por Janssen *et al.*), los resultados obtenidos han sido satisfactorios, considerando los distintos autores que esta técnica puede ser útil en estudios de identificación y caracterización de cepas de E. granulosus, aunque quizá pueda ser conveniente corroborar los resultados obtenidos con los procedentes de otras técnicas (Janssen *et al.*, 1990).

OBJETIVOS

3. OBJETIVOS

En el presente trabajo de investigación, son fundamentalmente tres los objetivos perseguidos:

1. Caracterizar las cepas de Echinococcus granulosus previamente identificadas en España mediante análisis de ADN (cepas ovina, equina y suina), en base a su capacidad de desarrollo *in vitro* (hacia larva y adulto) e *in vivo* (hacia larva), y sus características morfométricas.
2. Determinar la posible influencia que la especie de hospedador intermediario puede tener sobre algunos de los caracteres fenotípicos normalmente empleados en los estudios de diferenciación e identificación de dichas cepas (morfometría de los ganchos larvarios, perfiles proteicos y antigénicos de líquidos hidatídicos).
3. Establecer, de forma indirecta, la(s) cepa(s) del parásito probable(s) causante(s) de las infestaciones humanas en España.

En base a estos objetivos, el presente trabajo se ha dividido en los siguientes apartados:

Caracterización del parásito:

- Estudio comparativo de las características del desarrollo *in vitro* de las distintas cepas del parásito, hacia larva y hacia adulto;

- Estudio comparativo del desarrollo *in vivo*, en dirección vesicular, de las distintas cepas, mediante el modelo de Hidatidosis Sencundaria Experimental (H.S.E.) en ratones;
- Estudio morfométrico comparativo de los ganchos larvarios de las diferentes cepas previamente identificadas mediante análisis genéticos, y aplicabilidad de esta técnica a estudios de identificación subespecífica en Echinococcus granulosus;
- Aplicación de todas estas técnicas a muestras humanas, y comparación de los resultados con los obtenidos en las muestras animales.

Influencia del hospedador:

- Comparación, mediante análisis morfométricos de los ganchos larvarios, y mediante análisis de los perfiles proteicos y antigénicos de líquidos hidatídicos, de muestras experimentales de las distintas cepas (obtenidas en el modelo de H.S.E.), con sus correspondientes muestras naturales;
- Comparación entre las muestras experimentales de las distintas cepas para determinar si, tras obtenerse en una misma especie de hospedador intermediario, se siguen manteniendo las diferencias observadas en las muestras naturales.

MATERIAL Y MÉTODOS

4. MATERIAL Y MÉTODOS

4.1. PROCEDIMIENTOS GENERALES

4.1.1. OBTENCIÓN Y TRANSPORTE DEL MATERIAL PARASITARIO

Las muestras del parásito han consistido en quistes de cualquier localización orgánica (principalmente, hígado y pulmón) desarrollados en ovinos, bovinos, equinos, suinos, caprinos y humanos de origen español. Todas las muestras fueron obtenidas durante el período 1990-1994, siendo los quistes procedentes de hospedadores animales facilitados por los servicios veterinarios de diferentes mataderos municipales y privados de las Comunidades Autónomas de Madrid, Castilla-La Mancha, Castilla-León, Extremadura, Aragón y Navarra. El material de origen humano ha sido facilitado por los Servicios de Cirugía de diferentes hospitales de Madrid, Castilla-La Mancha, Castilla-León y Navarra.

Las vísceras de los animales conteniendo las muestras del parásito fueron en su mayoría recogidas en los respectivos mataderos en el mismo día de sacrificio del animal, o en un plazo máximo de 3 días desde el mismo, habiendo sido entonces conservadas durante dicho tiempo en las cámaras frías de los mataderos, a una temperatura variable entre 5 y 10°C. El transporte fue realizado en contenedores de tamaño adecuado, sin refrigeración, no transcurriendo desde la entrega de la muestra biológica hasta su llegada al laboratorio más de 3 horas. En éste fueron procesadas inmediatamente, o mantenidas en cámara fría a 4°C durante un período máximo de 10 horas antes de su procesamiento.

En algunos casos las muestras biológicas fueron remitidas mediante servicios de mensajería urgente, siendo entonces procesadas en un plazo máximo de 24 horas desde el sacrificio del animal.

Respecto a las muestras humanas, éstas consistieron en quistes extirpados de la víscera parasitada, o en aspirados de dichos quistes, siendo en su mayoría recogidas en los distintos hospitales en un plazo máximo de 4 horas desde su obtención en quirófano. Las condiciones de transporte y almacenamiento fueron las mismas que las descritas para las muestras animales. En los casos en que las muestras fueron remitidas por mensajería urgente, fueron procesadas en plazos máximos de 24 horas desde su extirpación.

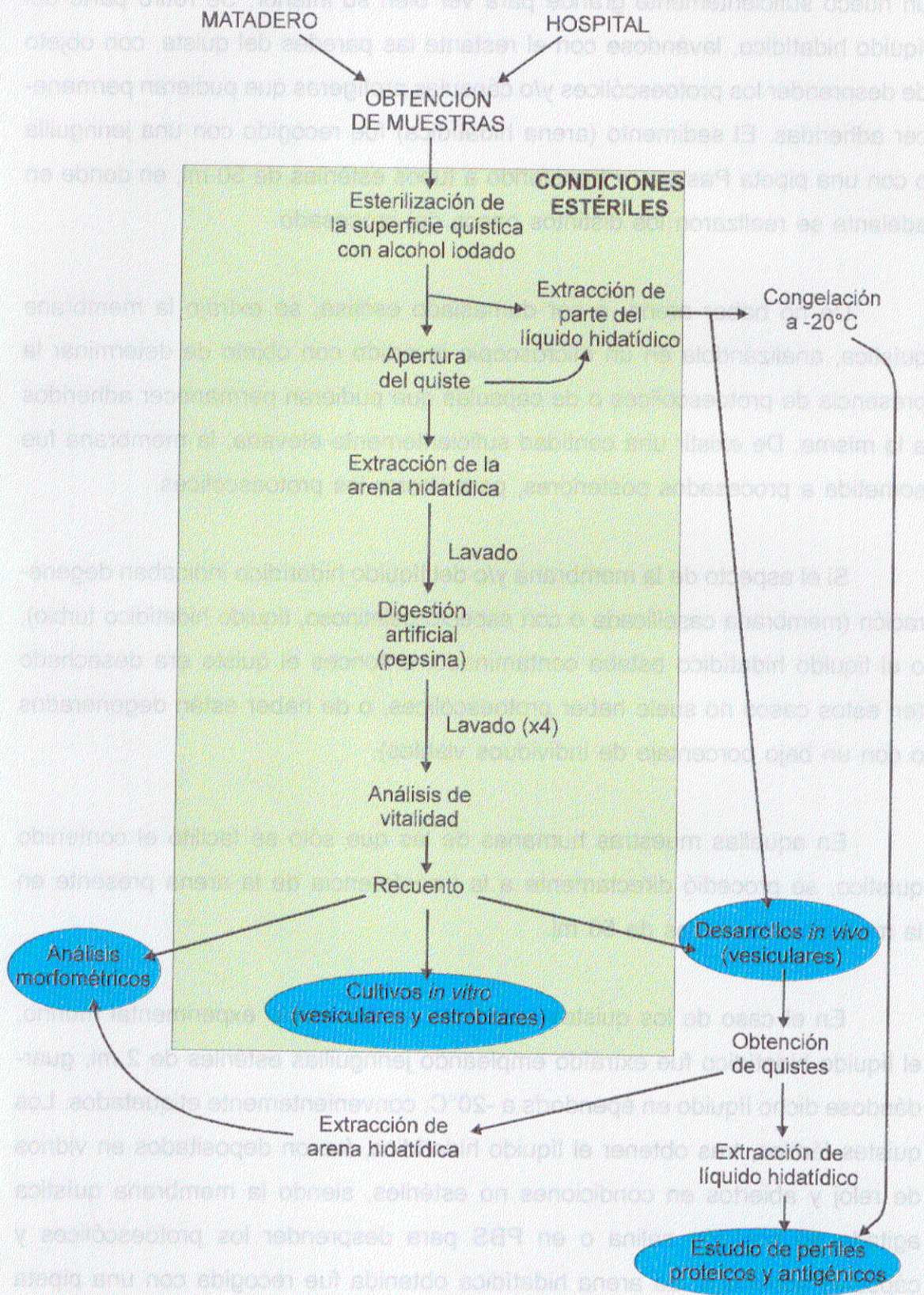
4.1.2. OBTENCIÓN DE LOS PROTOESCÓLICES

4.1.2.1. Disección de los quistes

Las distintas muestras biológicas, constituidas por la víscera parasitada (muestras animales) o por el quiste aislado (muestras humanas), fueron depositadas en bandejas de tamaño adecuado, siendo en adelante manipuladas en condiciones estériles, en el interior de campanas de flujo laminar.

Siguiendo el protocolo descrito por Smyth & Davies (1974c) y Smyth (1979a, 1985) (Figura 9), la superficie de los quistes y la zona adyacente del órgano parasitado fueron previamente desinfectadas mediante tinción con alcohol iodado (iodo al 1% en etanol 95°). A continuación se extrajo aproximadamente un tercio del líquido hidatídico, empleando jeringuillas estériles de 10 ml. Dichos líquidos, y los obtenidos una vez abiertos los quistes, fueron recogidos en tubos de centrifuga de plástico de 50 ml (Falcon, Cultek), estériles, siendo almacenados a 4°C durante cortos períodos de tiempo (hasta 4 horas) o congelados a -20°C. En todo momento se mantuvo identificado y separado el contenido de los diferentes quistes analizados.

Figura 9 - Protocolo seguido en la obtención de las muestras, y pruebas con ellas realizadas.



A continuación se procedió a la apertura de cada quiste, dejando libre un hueco suficientemente grande para ver bien su interior. Se retiró parte del líquido hidatídico, lavándose con el restante las paredes del quiste, con objeto de desprender los protoescólices y/o cápsulas prolíferas que pudieran permanecer adheridas. El sedimento (arena hidatídica) fue recogido con una jeringuilla o con una pipeta Pasteur, y transferido a tubos estériles de 50 ml, en donde en adelante se realizaron los distintos pasos del procesado.

De no haber arena, o ser demasiado escasa, se extrajo la membrana quística, analizándola en un microscopio invertido con objeto de determinar la presencia de protoescólices o de cápsulas que pudieran permanecer adheridos a la misma. De existir una cantidad suficientemente elevada, la membrana fue sometida a procesados posteriores, para liberar los protoescólices.

Si el aspecto de la membrana y/o del líquido hidatídico indicaban degeneración (membrana caseificada o con aspecto gelatinoso, líquido hidatídico turbio), o el líquido hidatídico estaba contaminado, entonces el quiste era desechado (en estos casos no suele haber protoescólices, o de haber están degenerados o con un bajo porcentaje de individuos viables).

En aquellas muestras humanas de las que sólo se facilitó el contenido quístico, se procedió directamente a la transferencia de la arena presente en la muestra a los tubos de 50 ml.

En el caso de los quistes obtenidos en el modelo experimental murino, el líquido hidatídico fue extraído empleando jeringuillas estériles de 2 ml, guardándose dicho líquido en épendorfs a -20°C, convenientemente etiquetados. Los quistes fértiles, tras obtener el líquido hidatídico, fueron depositados en vidrios de reloj y abiertos en condiciones no estériles, siendo la membrana quística agitada en solución salina o en PBS para desprender los protoescólices y cápsulas adheridos. La arena hidatídica obtenida fue recogida con una pipeta

Pasteur y transferida a épendorfs, no siendo sometida a tratamientos posteriores (para evitar pérdidas en unas muestras en que el número de protoescólices fue siempre muy pequeño) y dedicándose, en todos los casos (siempre y cuando el porcentaje de viabilidad presente no hiciera descartar la muestra), a análisis morfométricos.

4.1.2.2. Digestión artificial

Tras dejar sedimentar durante unos minutos la suspensión de arena y restos de membranas, el sobrenadante fue sustituido por la solución lavadora (Tabla 10), a pH 7,2-7,4, siendo mantenida la muestra en agitación a 37°C durante 15 minutos. Transcurrido dicho tiempo esta solución fue sustituida por un volumen de solución de pepsina (solución digestora; Tabla 10), a pH 2, de aproximadamente 5 veces el de la arena hidatídica presente. La incubación en dicha solución se realizó a 37°C y en constante agitación, durante un tiempo variable (normalmente, 15-45 minutos), con objeto de liberar los protoescólices de las cápsulas prolíferas y digerir los muertos y restos de membranas o de tejidos del hospedador que pudieran estar presentes como contaminantes. La digestión se mantenía hasta que, por comprobación al microscopio invertido, los protoescólices fueran en su totalidad liberados.

Tabla 10 - Composición de las soluciones empleadas en el proceso de obtención de los protoescólices.

Solución lavadora

Solución salina de Hank (Gibco)	97,85 ml
HEPES (1 M) (Sigma)*	1,95 ml
Gentamicina comercial (80 mg/ml)	0,20 ml

pH de la solución: 7,2-7,4.

(*) Solución esterilizada por filtración en membranas de 0,22 µm. (Millipore).

Solución digestora

Solución salina de Hank (Gibco)	100,00 ml
Pepsina (1:10000) (Sigma)	0,20 g

Se ajusta a pH 2 con HCl y se esteriliza por filtración en membranas de 0,22 µm (Millipore). Se usa inmediatamente o se congela a -20°C por períodos máximos de un mes.

En caso de producirse durante el proceso una elevación en el pH de la solución (indicado por el viraje de color del indicador de pH), ésta fue sustituida por solución nueva, en la misma proporción antes indicada.

4.1.2.3. Lavados post-digestión

Una vez finalizada la digestión artificial, los tubos se dejaron sedimentar durante 1-2 minutos, sustituyéndose entonces el sobrenadante por solución lavadora (pH 7,2-7,4). Se realizaron un total de 4 lavados en dicha solución, manteniendo la muestra, en cada uno de ellos, a 37°C, en permanente agitación, durante 15 minutos.

Al finalizar este proceso se obtuvieron suspensiones estériles de protoescólices, libres de restos del quiste y/o del hospedador.

4.1.3. CONTROL DE LA VIABILIDAD DE LOS PROTOESCÓLICES

La viabilidad de los protoescólices de la muestra fue comprobada mediante observación al microscopio de una alícuota de la suspensión; en caso de obtener resultados negativos, se realizó otra observación con una segunda alícuota. Como criterios de valoración de la viabilidad de los protoescólices se utilizaron los siguientes (siguiendo a Smyth & Davies, 1974c; Howell, 1986; Smyth, 1990b):

- conservación de la morfología (aspecto del tegumento, presencia de corpúsculos calcáreos);
- movimientos generales de contracción;
- actividad de los solenocitos; y
- refractariedad a la coloración con azul de metileno al 1 ‰.

Las muestras con un porcentaje de protoescólices vivos inferior al 60% fueron descartadas, dados los pobres resultados que se suelen obtener con ellas (Smyth, 1979a).

4.1.4. RECUENTO DE PROTOESCÓLICES

En aquellos casos en que fuera preciso conocer el número aproximado de protoescólices presentes en la muestra, se realizó un recuento de los mismos en cámaras McMaster. Dicho recuento se realizó por duplicado, tomando una alícuota de la suspensión, tras agitación de la misma mediante repetidos llenados/vaciados de una pipeta Pasteur, siendo transferida inmediatamente dicha alícuota a la cámara de recuento, para evitar decantaciones de los protoescólices que pudieran falsear el resultado. En caso de que la cantidad de éstos fuese tan elevada que se hiciera difícil realizar el recuento de forma correcta, se procedía a la dilución de la suspensión con solución lavadora, repitiéndose de nuevo el proceso. Sólo se consideraron en el recuento aquellos individuos morfológicamente normales (no protoescólices vacuolizados o redondeados, sin corpúsculos calcáreos, o con cualquier otro indicio de alteración morfológica).

4.2. ESTUDIOS DE CARACTERIZACIÓN DE LAS CEPAS DEL PARÁSITO

4.2.1. PRUEBAS *IN VITRO*

4.2.1.1. Cultivos en dirección vesicular

4.2.1.1.1. Dosificación de los protoescólices

A partir de la suspensión final de protoescólices, y tras realizar su recuento, se calculó el volumen de dicha suspensión necesario para obtener una con-

centración final, en el cultivo, de 800-1.000 protoescólices/ml. El reparto entre los recipientes de cultivo (2 a 4 por muestra) se realizó empleando pipetas Pasteur, agitando la suspensión mediante repetidos llenados/vaciados de la mismas; una vez transferidos, los protoescólices se dejaron decantar durante 1-2 minutos, sustituyéndose a continuación la solución lavadora por el medio de cultivo, a 37°C.

4.2.1.1.2. Medio y condiciones de cultivo

Los cultivos se llevaron a cabo en tubos Leighton de vidrio de 10 ml (Bellco), o en frascos Roux de cultivo celular de 50 ml (Costar, Cultek, Greiner o Nunclon), no observándose diferencias en los resultados obtenidos en pruebas previas realizadas con material de origen ovino; el empleo posterior de un tipo u otro de recipiente estuvo, pues, en función del número de protoescólices disponibles para la experiencia. No obstante, en los casos en que fue posible, se utilizaron conjuntamente ambos tipos de recipientes, para detectar cualquier posible diferencia debida a ellos.

El medio base empleado en todos los casos fue CMRL 1066 (uno de los indicados como válidos por Casado & Rodríguez-Caabeiro, 1988c, y Smyth,

Tabla 11 - Composición del medio de cultivo empleado en los desarrollos vesiculares.

CMRL 1066 (Gibco)	63,00 ml
Suero Fetal de Ternera (Sera Lab, Gibco)	25,00 ml
Extracto de levadura (Oxoid)**	9,00 ml
Glucosa (30% en agua destilada)*	1,40 ml
HEPES (1 M) (Sigma)*	1,30 ml
Gentamicina comercial (80 mg/ml)	0,30 ml

(*) Esterilizados por filtración en membranas de 0,22 µm (Millipore).

(**) Preparado al 5% en CMRL 1066, y esterilizado por filtración en membranas de 0,22 µm. Congelado a -20°C hasta el momento de su utilización.

1990b), suplementado con suero fetal de ternera, glucosa, L-glutamina y extracto de levadura, y adicionado con HEPES y antibióticos (Tabla 11). Si bien distintos autores han observado desarrollos vesiculares en medios de composición química más sencilla (p.e., Heath & Osborn, 1976; Casado & Rodríguez-Caabeiro, 1988c), nosotros nos decidimos por un medio complejo, con objeto de satisfacer al máximo los requerimientos nutricionales que las distintas muestras tuvieran, de modo que la falta de éxito en la consecución del desarrollo completo no pudiera achacarse al medio.

En todos los casos, los tubos/frascos de cultivo se mantuvieron en estufa a 37°C y en permanente agitación. No se empleó una fase gaseosa especial, ya que, según Smyth (1990b), y en base a los resultados obtenidos por nosotros durante el período de ajuste de la técnica, no se mostró como un factor importante, consiguiéndose con su no utilización una simplificación de los equipos de cultivo.

El medio se cambió regularmente, cada 2-3 días (o diariamente cuando fuera necesario), manteniendo la temperatura del cultivo próxima a los 37°C.

4.2.1.1.3. Controles realizados y parámetros de desarrollo considerados

Los cultivos fueron observados cada 1-2 días en un microscopio invertido Olympus IM, a aumentos de 40-400x, y a una temperatura próxima a la de cultivo. Se tomaron datos sobre el aspecto general del cultivo y su evolución, tanto en lo referente al proceso de desarrollo (vesiculización externa o vacuolización interna) como en el tiempo necesario para alcanzar cada estadio, y el porcentaje aproximado de individuos en los mismos. Se consideraron las siguientes etapas de desarrollo:

- Fase I (fase inicial): protoescólices con morfología normal, invaginados o evaginados, móviles.
- Fase II (inicio de vesiculización): pérdida de la morfología normal, con aparición de exovesículas o de procesos de vacuolización interna (aspecto redondeado). Movilidad disminuida, en ocasiones ausente.
- Fase III (premicroquistes): formas completamente vacuolizadas, o con exovesículas de gran tamaño; en las primeras no se reconocen mas que los restos de las ventosas. Sin apenas movimientos. No se ha formado aún la membrana laminar.
- Fase IV (microquistes): similar al estadio anterior, pero con formación de membrana laminar.

Los cultivos se dieron por finalizados cuando se detectó la presencia de microquistes en los mismos, o en fases anteriores de desarrollo si se producían contaminaciones o si el número de protoescólices vivos disminuía por debajo del 50%.

En los casos en que se tomaron fotos de los cultivos, éstas se realizaron con un equipo automático, en una cámara Olympus C35AD-2 acoplada al microscopio.

4.2.1.2. Cultivos en dirección estrobilar

4.2.1.2.1. Evaginación y dosificación de los protoescólices

Siguiendo el protocolo descrito por Smyth & Davies (1974c) y Smyth (1979a, 1985, 1990b), se procedió a la estimulación de la evaginación de los protoescólices, requisito previo a su puesta en cultivo. Para ello, se retiró, de

la suspensión final de protoescólices, la solución lavadora, añadiéndose en su lugar la solución evaginadora (bilis de perro al 5% en CMRL 1066; esterilizada por filtración a 0,22 μ m), en la cual se mantuvo la muestra durante 18-24 horas, a 37°C y en agitación. Al final de este proceso se comprobó, por observación al microscopio invertido, la presencia de individuos evaginados (variable entre el 10-60%, según Smyth, 1979a).

A continuación se procedió a la dosificación de los protoescólices entre los distintos recipientes de cultivo, de la misma forma descrita anteriormente (apartado 4.2.1.1.1. de Cultivos en dirección vesicular).

4.2.1.2.2. Medio y condiciones de cultivo

Como en el caso de los cultivos vesiculares, los cultivos estrobilares se llevaron a cabo en tubos Leighton de vidrio de 10 ml o en frascos Roux de cultivo celular, de 50 ml.

El medio de cultivo fue difásico, constituido por un sustrato sólido proteico y un medio líquido. El sustrato sólido consistió en suero de ternero recién nacido de varias marcas (Gibco, Sera-Lab, Sigma), coagulado a 76-80°C durante 30-50 minutos. El volumen de dicho sustrato sólido fue variable, en función del recipiente de cultivo empleado: 3 ml, en el caso de los tubos Leighton, y 10 ml, en el caso de los frascos Roux. En ambos casos el suero fue coagulado en el fondo de los recipientes, si bien en los tubos Leighton, como consecuencia de su menor sección, la coagulación se hizo en bisel. Posteriormente, tras dejar enfriar el suero coagulado, se realizaron (siguiendo a Smyth & Davies, 1974c) repetidas perforaciones en su superficie con una pipeta Pasteur, con objeto de, en cierta medida, simular a *grosso modo* las microvellosidades intestinales.

Tabla 12 - Composición del medio de cultivo empleado en los desarrollos estrobilares.

<u>Fase líquida</u>		<u>Fase sólida</u>
CMRL 1066 (Gibco)	62,13 ml	Suero de Ternero Recién Nacido (Gibco, Sera-Lab, Sigma) coagulado a 76-80°C durante 30-50 minutos.
HEPES (1 M) (Sigma)*	1,24 ml	
Suero Fetal de Ternera (Sera-Lab, Gibco)	24,85 ml	
Extracto de levadura (Oxoid)**	8,95 ml	
Glucosa (30% en agua destilada)*	1,39 ml	
Bilis de perro ***	0,35 ml	
Gentamicina comercial (80 mg/ml)	0,22 ml	

En el momento de renovar el medio de cultivo, se añade el volumen necesario de L-glutamina**** para obtener una concentración de ésta en el medio de 0,87 mg/ml.

- (*) Esterilizados por filtración en membranas de 0,22 μ m (Millipore).
 (**) Preparado al 5% en CMRL 1066, y esterilizado por filtración en membranas de 0,22 μ m. Congelado a -20°C hasta el momento de su utilización.
 (***) Preparada al 5% en solución salina de Hank y esterilizada por filtración en membranas de 0,22 μ m. Mantenido en nevera a 4°C hasta el momento de su utilización.
 (****) L-glutamina (Merck) al 3% en agua destilada, esterilizada por filtración en membranas de 0,22 μ m y congelada a -20°C hasta el momento de su uso.

La composición del medio líquido empleado (Tabla 12) siguió la indicada por Smyth (1990b), con ligeras modificaciones. Así mismo, durante la puesta a punto de la técnica, se consideró como un factor importante para el desarrollo normal del parásito la adición de L-glutamina al cultivo, siendo preferible que se realizara en cada cambio de medio de los cultivos, en vez de en la constitución del medio.

Las condiciones de mantenimiento (temperatura, agitación, fase gaseosa, cambios de medio) fueron similares a las indicadas para los cultivos vesiculares. En este caso, además, los distintos recipientes de cultivo se colocaron de manera que la superficie de la fase sólida estuviera más o menos horizontal, con objeto de evitar acúmulos de protoescolices en un extremo y permitir que toda la superficie estuviera efectivamente disponible para todos los individuos del cultivo.

4.2.1.2.3. Controles realizados y parámetros de desarrollo considerados

Las condiciones de observación (microscopio, aumentos, temperatura) fueron idénticas a las respectivas de los cultivos vesiculares. Del mismo modo, también se tomaron datos sobre el aspecto general del cultivo y su evolución (estadios de desarrollo alcanzados y tiempo necesario para ello), y sobre el porcentaje aproximado de individuos en las distintas fases.

Siguiendo a Smyth (1979a, 1990b), con ligeras modificaciones, los distintos estadios de desarrollo considerados han sido los siguientes:

- Fase inicial: protoescólices con morfología normal, invaginados y evaginados, obtenidos tras el proceso de evaginación.
- Aparición de canales y vesícula excretoras; individuos evaginados, activos.
- Pérdida de corpúsculos calcáreos; ligero crecimiento.
- Presegmentación: animales claramente más grandes, con canales patentes y sin prácticamente corpúsculos calcáreos. Activos.
- Bando: se inicia la formación del primer segmento, marcada como una pequeña banda hacia la mitad del estróbilo.
- Formación del primer segmento: el tabique de separación es claramente visible.
- Formación del segundo segmento: se aprecian dos anillos en el estróbilo; en ocasiones puede apreciarse un pequeño oscurecimiento del anillo más antiguo, debido al inicio de formación de los testículos.
- Formación de los testículos, visibles como cuerpos de aspecto redondeado, a veces algo difuminados.
- Aparición del poro genital.
- Formación del útero.
- Aparición de huevos completamente desarrollados en el útero.

Los cultivos se dieron por finalizados cuando la mayoría de los individuos degeneraron hacia procesos de vesiculización o murieron, o cuando se produjeron contaminaciones.

En los casos en que se tomaron fotos de los cultivos, éstas se realizaron con un equipo automático, según se ha indicado anteriormente.

4.2.2. PRUEBAS *IN VIVO* (DESARROLLOS BIOLÓGICOS EN DIRECCIÓN VESICULAR)

4.2.2.1. Animales de experimentación

Para las distintas experiencias llevadas a cabo en el modelo de H.S.E. se emplearon ratones (*Mus musculus*) hembras de 30-45 días de edad (aproximadamente, 20-25 g. de peso) de la estirpe NMRI, criados en el animalario del laboratorio. No recibieron ningún tratamiento previo de desparasitación, ya que en estudios previos llevados a cabo en el Departamento no se han observado diferencias significativas entre la presencia o no de otros parásitos intestinales respecto al desarrollo posterior de los quistes hídaticos secundarios.

Los animales fueron mantenidos en jaulas de tamaño adecuado, a 20-25°C de temperatura, y con agua y comida *ad libitum* durante todo el período de experimentación.

4.2.2.2. Inoculación de los animales

A partir de la suspensión estéril de protoescolices, y una vez calculada la cantidad presente de éstos, se retiró la solución lavadora, añadiéndose el

volumen adecuado del vehículo de inoculación para obtener una concentración final de 3.500-4.000 protoescólices/ml (en el caso de las muestras de origen equino, de las que disponíamos de datos previos que indicaban un desarrollo peor, la concentración se aumentó en algunos casos hasta 8.000-10.000 protoescólices/ml, con el fin de intentar aumentar el número de quistes finalmente desarrollados).

El vehículo de inoculación consistió (siguiendo a Cuesta & Martínez, 1982) en líquido hidatídico (preferiblemente, el obtenido del mismo quiste del que proceden los protoescólices a inocular; si no, de otros quistes del mismo animal hospedador, o, en último lugar, de quistes de otros animales de la misma especie), al cual se añadió 3 mg/ml de EDTA (para impedir la lisis inicial de los protoescólices debida a la acción del complemento -Kassis & Tanner, 1976b-) y 0,15 mg/ml de gentamicina (equivalente a 0,1 ml de gentamicina comercial - 80 mg/ml- por cada 50 ml de líquido hidatídico).

La suspensión de inoculación fue mantenida en permanente agitación durante todo el tiempo, en un agitador magnético. Cada animal recibió 0,5 ml de dicha suspensión (1.700-2.000 protoescólices), por vía intraperitoneal, empleando jeringuillas desechables de insulina de 1 cm³, mantenidas en todo momento en posición vertical para asegurarse de que, aunque decantaran los protoescólices, todos fueron inoculados.

4.2.2.3. Controles realizados y parámetros de desarrollo considerados

En cada lote de animales se emplearon entre 40 y 70 ratones, según la disponibilidad de material parasitario y de animales de las características adecuadas. Se realizaron controles de los distintos lotes cada 1-3 semanas, en función del tiempo post-infestación y del número de ratones disponible en cada

lote; no obstante, en base a experiencias previas desarrolladas en nuestro laboratorio con muestras de origen ovino (Cuesta & Martínez, 1982, 1984b, d), se consideró como más adecuado realizar controles semanales durante los 2-3 primeros meses, ya que es durante este período cuando los protoescólices se desarrollan a microquistes y éstos a quistes visibles a simple vista; en meses sucesivos, en que sólo hay crecimiento del parásito, los controles podrían realizarse más espaciados en el tiempo, hasta los 9-10 meses, momento a partir del cual pueden empezar a aparecer quistes fértiles.

En cada control se sacrificaron entre 1 y 3 ratones, mediante ligera anestesia de los animales con éter dietílico y posterior dislocación cervical de los mismos. En la necropsia se tomaron datos sobre el número de quistes, su aspecto, tamaño y localización, y sobre su grado de desarrollo. Los distintos estadios evolutivos considerados fueron los siguientes (siguiendo a Cuesta & Martínez, 1982, 1984b, con modificaciones):

- Tipo I: pequeños granulomas blancos o amarillentos, libres en la cavidad intestinal o fijados a la superficie de diferentes órganos (principalmente hígado), formados por protoescólices en su mayoría vivos, con morfología normal.
- Tipo II: similar al anterior, pero los protoescólices han empezado a vesicular, en su casi totalidad por vacuolización interna. Pueden observarse protoescólices muertos (aspecto denso, oscuro) en mayor o menor cantidad.
- Tipo III: como el anterior, pero hay microquistes totalmente formados, con una o varias laminaciones rodeándoles.
- Tipo IV: quistes visibles a simple vista, hialinos, con un tamaño comprendido entre 0,5-30 mm de diámetro, presentes en forma aislada o en racimos, sin protoescólices ni cápsulas prolíferas.
- Tipo V: similar al anterior, pero hay quistes fértiles, normalmente de tamaño superior a los 10 mm de diámetro.

En aquellos casos en que se tomaron fotografías de los ratones o de los quistes que éstos contenían, se empleó una cámara réflex con diferentes objetivos y lentes de aumento. En el caso de las fotografías de los estadios iniciales de desarrollo, o de la arena obtenida de los quistes fértiles, se realizaron con un equipo automático conectado a un microscopio invertido, como ya se ha indicado en apartados anteriores.

4.2.3. ANÁLISIS MORFOMÉTRICOS

4.2.3.1. Fijación y almacenamiento de las muestras

El material parasitario empleado por nosotros ha consistido únicamente en protoescólices obtenidos de quistes desarrollados en diferentes hospedadores naturales, ya que en nuestras instalaciones no es posible mantener perros ni manipular de forma segura individuos adultos de este parásito.

Una vez obtenida la suspensión estéril de protoescólices, y tras comprobar su viabilidad, una pequeña cantidad de los mismos fue dedicada a análisis morfométricos. En caso de disponer de suficientes protoescólices, un pequeño volumen de la suspensión (conteniendo entre 0,01-0,05 ml de protoescólices sedimentados) era extraído mediante una pipeta Pasteur y transferido a un épendorf; si en la muestra inicial había pocos (o relativamente pocos) protoescólices, éstos eran primero distribuidos para su empleo en las distintas pruebas que con ellos se realizaran (cultivos, inoculación de ratones), empleando los sobrantes para los estudios morfométricos. Sólo en los casos en que el número de protoescólices obtenidos de un quiste fuese muy pequeño, todos eran dedicados a análisis morfométricos.

Una vez sedimentados los protoescólices en el épendorf, se retiró el sobrenadante y se añadió un volumen de aproximadamente 0,3 ml de alcohol 70°-glicerina (1:1), agitando la suspensión con llenados/vaciados de una pipeta Pasteur para asegurarse de la fijación de toda la muestra. A continuación, el épendorf fue convenientemente etiquetado y almacenado en posición vertical, a temperatura ambiente, hasta el momento de realizar las mediciones.

4.2.3.2. Condiciones de medición

Todas las mediciones se realizaron en el mismo microscopio (Olympus BH-2), a 1.000 aumentos, con una escala ocular graduada, equivaliendo cada división de dicha escala a 1 μm de longitud real.

Los protoescólices fueron montados en preparaciones temporales, mezclando en el portaobjetos una gota de la suspensión fijada y una gota de lactofenol (para aclarar los protoescólices y facilitar la observación y medición de los ganchos). A continuación se colocó el cubreobjetos, aplicando sobre éste la suficiente presión para provocar la separación y ladeamiento de los ganchos.

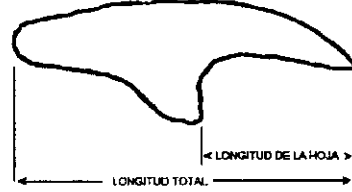
En los casos en que se tomaron fotografías de las preparaciones, éstas se realizaron con un equipo automático, empleando una cámara Olympus C35AD-2 acoplada al microscopio.

4.2.3.3. Tamaño muestral y parámetros considerados

Las únicas estructuras rígidas, y por tanto no susceptibles de ser alteradas (deformadas) durante la manipulación de las muestras, son los ganchos del rostelo, siendo éstos, por consiguiente, el objeto del análisis morfométrico. Se han analizado muestras procedentes de ovinos, equinos, suinos, bovinos y humanos; no se han encontrado, durante el período de estudio, muestras caprinas fértiles.

Se han considerado como variables (siguiendo a Sweatman & Williams, 1963; Williams & Sweatman, 1963; Kumaratilake & Thompson, 1984a; Kumaratilake *et al.*, 1986b; Hobbs *et al.*, 1990) el número, forma y disposición de los ganchos del rostelo, y las longitudes total y de la hoja de los ganchos grandes y pequeños (Figura 10).

Figura 10 - Medidas realizadas en los ganchos de los protoescólices.



La toma de datos se realizó sobre protoescólices invaginados (para evitar posibles pérdidas de ganchos) y de aspecto no degenerado (para evitar alteraciones debidas a la degeneración), escogidos al azar. En los casos en que no fuera posible realizar de forma satisfactoria todas las mediciones sobre un mismo protoescólex, éste era descartado.

El tamaño mínimo de población se estimó a partir de los datos obtenidos en muestreos realizados sobre 3 muestras de cada especie de hospedador (15 muestras en total). Para dicha estimación se consideraron inicialmente 5 protoescólices por muestra para las variables de longitud, midiéndose 4 ganchos grandes y 4 pequeños por rostelo (en total, 20 datos por variable); y 20 protoescólices por muestra, para el número de ganchos.

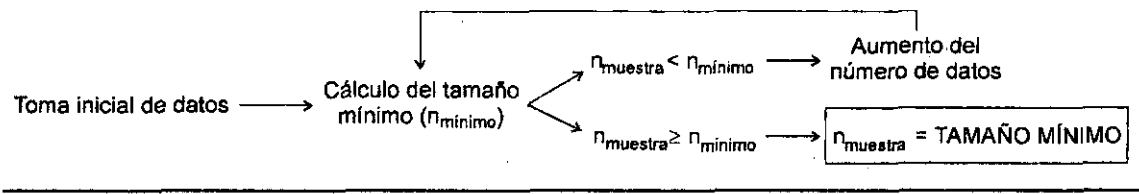
A partir de estos datos se calculó, para cada muestra y variable, el tamaño mínimo de población, mediante la fórmula (Cochran, 1977)

$$N = \frac{s^2 (t_{\alpha/2})^2}{\sum^2} \left(1 + \frac{2}{n}\right)$$

siendo

N	tamaño mínimo de muestra;
n	tamaño de la muestra inicial;
s ²	varianza obtenida a partir de los datos del premuestreo;
α	nivel de probabilidad (por defecto, α = 5%);
t _{α/2}	valor del estadístico t, con (n-1) grados de libertad, para una probabilidad α/2;
Σ	error máximo que se pretende cometer (diferencia entre la media muestral y la media real).

Figura 11 - Procedimiento seguido en la determinación del tamaño mínimo de muestra.



En caso de que, tras esta toma de datos inicial, no coincidieran el tamaño estimado y el tamaño empleado, se tomarían más datos y se recalcularía el tamaño mínimo. Este proceso, esquematizado en la Figura 11, se repetiría hasta que el número de datos analizados fuese igual o superior al tamaño estimado.

En el caso de la variable *número de ganchos*, como tamaño muestral mínimo se escogió el mayor de los tamaños mínimos calculados; de este modo, en todos los casos el mínimo sería igualado o superado.

Procediendo de la misma forma con las variables de longitud, cada una de ellas tendría un tamaño mínimo de muestra diferente; con objeto de poder disponer de todas las medidas de los ganchos que se analizaran, se optó por emplear un tamaño muestral común, tomándose entonces como tamaño muestral mínimo, el de la variable más exigente (aquella que necesitara de más datos). De este modo, en todos los casos se igualaría o superaría también el mínimo necesario.

4.2.3.4. Tratamiento de los datos. Análisis estadísticos

El tratamiento matemático se ha realizado en un ordenador PC compatible, empleándose el programa estadístico SPSS, versión 5.0 para Windows (SPSS Inc., 1992).

Para la comparación entre las distintas muestras se optó por técnicas multidimensionales, ya que éstas son las que mejor responden a nuestros objetivos, a saber:

- 1 - conocer las relaciones existentes entre las variables;
- 2 - analizar la dispersión de las observaciones (poniendo en evidencia posibles agrupamientos), detectando las variables que sean responsables de dicha dispersión;
- 3 - determinar si se trata de grupos bien diferenciados, y, en tal caso, determinar la variable, o conjunto de variables, que mejor discriminen entre dichos grupos; y
- 4 - establecer un método sencillo de clasificación de nuevas observaciones en uno de los grupos existentes.

Siguiendo a Judez (1989), como método de análisis factorial se empleó el análisis de componentes principales (puntos 1 y 2), y el análisis de discriminantes para la identificación y clasificación de los posibles grupos detectados (puntos 3 y 4).

4.3. ESTUDIO DE LA INFLUENCIA DEL HOSPEDADOR

4.3.1. ANÁLISIS MORFOMÉTRICOS

La arena hidatídica obtenida de los quistes desarrollados en el modelo de H.S.E. fue dedicada a estudios morfométricos, siendo procesada del mismo modo descrito anteriormente (ver apartado 4.2.3.1. *Fijación y almacenamiento de las muestras*). En estos casos, el lapso de tiempo entre su extracción del quiste y su fijación fue de 10-15 minutos. Se utilizaron las mismas variables y los mismos tamaños muestrales calculados para las muestras naturales; el tratamiento de los datos se realizó de la misma forma indicada para estas muestras.

4.3.2. ANÁLISIS DE PERFILES PROTEICOS Y ANTIGÉNICOS EN LÍQUIDOS HIDATÍDICOS DE QUISTES MURINOS

4.3.2.1. Origen, obtención y procesamiento de los líquidos hidatídicos

Sólo se han empleado líquidos hidatídicos de quistes obtenidos de ratones pertenecientes a lotes inoculados con material de un único quiste natural, y los líquidos hidatídicos de los correspondientes quistes naturales. La única excepción han sido los quistes obtenidos de ratones del lote inoculado con protoescolices de origen suino, ya que éste ha sido el único lote de este tipo de material que ha podido ser inoculado satisfactoriamente, y en él se emplearon protoescolices procedentes de tres quistes diferentes, si bien todos ellos obtenidos de la misma víscera del mismo animal hospedador.

Los líquidos hidatídicos fueron obtenidos según se ha descrito anteriormente (ver apartado 4.1.2.1. *Disección de los quistes*); los líquidos procedentes de quistes de un mismo ratón fueron agrupados como muestra única, con objeto de minimizar las posibles diferencias individuales de cada quiste debidas a su localización, y para aumentar el volumen de muestra disponible. Una vez obtenidos, los distintos líquidos fueron centrifugados a 13.000 rpm, durante 15 minutos, para eliminar posibles restos de membranas y/o protoescolices. A continuación, fueron convenientemente etiquetados y almacenados a -20°C hasta el momento de su utilización.

4.3.2.2. Valoración de proteínas

Se valoró la concentración de proteínas en los diferentes líquidos hidatídicos, mediante el método de Bradford (1976) (microensayo), siguiendo las recomendaciones de la casa comercial (Bio-Rad) que suministró el reactivo, y utilizando como patrón la albúmina sérica bovina. En aquellos casos en que la concentración de proteínas fuese inferior a 1 mg/ml, dichas muestras fueron concentradas en una célula Amicon, con membranas YM10 (Amicon), a 4°C,

hasta que la concentración total de proteínas en las mismas fuese igual o superior al límite antes indicado.

4.3.2.3. Purificación de las muestras

Tras la valoración, cada muestra fue sometida a purificación mediante columna de inmunoadsorción, preparadas y utilizadas según el protocolo descrito en la Tabla 13. De este modo, las proteínas del hospedador que pudieran haber pasado al interior del quiste serían eliminadas de la muestra.

Tabla 13 - Preparación y utilización de las columnas de inmunoadsorción.

Preparación de la columna:

- 1- Suspender 1 g de sefarosa activada con bromuro de cianógeno (CNBr-Sepharosa, Pharmacia) en 10 ml de HCl 1 mM, dentro de la columna.
- 2- Agitar (en rotación) la suspensión durante 15 minutos.
- 3- Lavar la columna con 200 ml de HCl 1 mM.
- 4- Lavar la columna con 67 ml de tampón de acoplamiento (NaHCO_3 0,1 M, NaCl 0,5 M; pH 8,3). La columna queda a pH 8,3.
- 5- Diluir el antisuero que se desea fijar a la columna en tampón de acoplamiento (5 ml dilución/g sefarosa), hasta una concentración de 1-5 mg de proteínas por ml de tampón. Los distintos antisueros totales fueron suministrados por Sigma ImmunoChemicals.
- 6- Verter la dilución en la columna; mantener en agitación (en rotación) durante 16 horas, a 4°C.
- 7- Lavar con tampón de acoplamiento (34 ml) y leer el eluido a 280 nm. Calcular los miligramos de proteínas que han quedado fijados a la columna.
- 8- Añadir 14 ml de tampón bloqueante (glicina 0,2 M, pH 3) y mantener en agitación rotatoria 16 horas a 4°C.
- 9- Lavar en tres ciclos con:
 - 100 ml de tampón de lavado (tampón acetato 0,1 M, NaCl 0,5 M, pH 4)
 - 100 ml de tampón de acoplamiento.
- 10- Dejar la columna almacenada a 4°C, tapada, con una pequeña cantidad de PBS-azida sódica (0,02%, pH 7,2).

Utilización:

- 1- Lavar la columna con 34 ml de PBS (para eliminar la azida sódica).
- 2- Añadir el líquido hidatídico a purificar, diluido en tampón de acoplamiento, de modo que la concentración de proteínas de la dilución no exceda la capacidad de unión del antisuero fijado a la columna.
- 3- Pasar esta dilución por la columna tantas veces como sea necesario, hasta que la concentración de proteínas en el eluido sea constante.
- 4- Guardar los líquidos purificados a -20°C.
- 5- Recuperar la columna lavándola con 34 ml de tampón de elución (glicina 0,05 M, NaCl 0,15 M, pH 2,3), e inmediatamente con PBS (pH 7,2).
- 6- Repetir el proceso (punto 2) o almacenar con azida.

4.3.2.4. Análisis de perfiles proteicos: electroforesis (SDS-PAGE) y revelado de los geles

La separación de proteínas se hizo en condiciones reductoras mediante SDS-PAGE, en un gradiente continuo de concentración 5-20%, y en sistema discontinuo (gel de concentración sobre gel de resolución), según el método descrito por Laemmli (1970) y revisado por Hames (1986). Estas condiciones se han probado como válidas en nuestro laboratorio, para análisis de este tipo (Siles, 1993).

Las muestras se prepararon empleando el volumen necesario de las mismas conteniendo 25 µg de proteínas, y ajustando el volumen final a 35 µl con tampón de muestra (azul de bromofenol 0,02% - SDS 10%, diluido 1:1 en tampón de electroforesis) y con la adición de 2-mercaptoetanol (10% del volumen final). Las muestras así preparadas fueron hervidas durante 5 minutos, para provocar la reducción de los puentes disulfuro.

Las electroforesis se llevaron a cabo durante aproximadamente 2 horas, en cubetas Mini Protean II (Bio-Rad), a 100 V constantes durante todo el recorrido del frente.

Una vez finalizadas la electroforesis, se procedió a la tinción de los geles con Azul Coomasie R-250 (2,6 g en 400 ml de etanol, 100 ml de ácido acético y 500 ml de agua) durante un tiempo mínimo de 1 hora. La decoloración se realizó en etanol-acético-agua (4:1:5), manteniendo el gel en agitación durante el tiempo que fuera necesario, hasta que fuera transparente. Tras la decoloración, el gel se dejó en agua destilada durante 1 hora, para evitar resquebrajamiento en el secado. Éste se realizó sobre papel de filtro, en un secageles (Slab Dryer Model 443, Bio-Rad), a 80°C, durante 2-3 horas.

4.3.2.5. Análisis de perfiles antigénicos

4.3.2.5.1. Obtención de sueros hiperinmunes. Valoración de los mismos mediante ELISA e inmunoelectroforesis

Se emplearon conejos (raza Nueva Zelanda) de 68-74 días de edad, con un peso medio de 2,5 Kg. Durante 4 semanas, dichos animales fueron inoculados subcutáneamente (una vez a la semana) con líquidos hidatídicos purificados y concentrados, procedentes de quistes ovinos, equinos, suinos y humanos, en proporción 1:1 con adyuvante completo de Freund, en un volumen final de 1 ml y a una concentración proteica de 10 mg/ml. Estos conejos fueron sangrados semanalmente, durante 12 semanas.

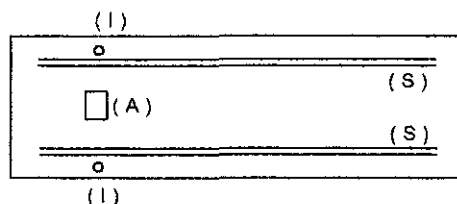
La valoración de los sueros obtenidos se realizó mediante ELISA (siguiendo el protocolo descrito en la Tabla 14), para conocer la evolución de los niveles de anticuerpos a lo largo de las 12 semanas, permitiéndonos escoger los sueros con niveles más altos de anticuerpos; y mediante inmunoelectroforesis (según el protocolo descrito por Varela-Díaz & Coltorti, 1974, recogido en la Tabla 15), para comprobar que los sueros escogidos, en base a su positividad en ELISA, dieran lugar al arco 5 (descrito por Capron *et al.*, 1967), reacción de inmunoprecipitación característica de sueros positivos a hidatidosis.

Tabla 14 - Procedimiento de valoración, mediante la técnica ELISA, de los sueros hiperinmunes.

- 1 - Tapizado de las placas de ELISA (96 pocillos) con 100 μ l (0,5 μ g)/pocillo del antígeno (líquido hidatídico purificado por columna de inmunoadfinidad, según el protocolo descrito en la Tabla 13, y diluido a 5 μ g/ml en tampón carbonato 0,1 M, pH 9,6). Incubación durante 16 horas a 4°C.
- 2 - Lavado de los pocillos (tres veces) con PBS - 0,05% Tween 20-0,1% BSA.
- 3 - Post-tapizado de las placas con 250 μ l/pocillo de PBS - 0,1% BSA. Incubación durante 2 horas a 37°C.
- 4 - Lavado de los pocillos (punto 2).
- 5 - Adición de 100 μ l/pocillo de los sueros hiperinmunes (diluidos al 1/150 en PBS - 0,05% Tween 20 - 0,1% BSA). Incubación durante 2 horas a 37°C.
- 6 - Lavado de los pocillos (punto 2).
- 7 - Adición de 100 μ l/pocillo del conjugado (anti-Ig totales de conejo), marcado con peroxidasa, a una dilución 1/1.000 en PBS - 0,05% Tween 20 - 0,1% BSA. Incubación durante 1 hora a 37°C.
- 8 - Lavado de los pocillos (punto 2).
- 9 - Adición de 100 μ l/pocillo del sustrato (ortofenildiamina), diluido al 0,04% en tampón citrato-fosfato (pH 5) - 0,04% H₂O₂ (33% p/V). Incubación a temperatura ambiente y en oscuridad.
- 10 - Frenado de la reacción con 50 μ l/pocillo de ácido sulfúrico 3 N.
- 11 - Lectura de la densidad óptica a 492 nm.

Tabla 15 - Protocolo seguido en la realización de las inmunolectroforesis de los sueros hiperinmunes (siguiendo a Varela-Díaz & Coltorti, 1974):

- 1 - Preparación, sobre portaobjetos desengrasados, de geles de agarosa (2,5 ml/portaobjeto, de agarosa al 1% en tampón veronal sódico 0,05 M, pH 8,6).
- 2 - Realización de los pocillos correspondientes a los sueros (S), al antígeno (A), y a los indicadores del frente de electroforesis (I), según el siguiente esquema:



- 3 - Vaciado de los huecos de los pocillos correspondientes al indicador y al antígeno, y llenado con éstos (respectivamente, azul de bromofenol, y antígeno diluido a 200 mg/ml en tampón veronal sódico).
- 4 - Electroforesis, durante 4 horas (el equivalente a un desplazamiento del indicador de unos 35 mm), con una diferencia de potencial entre extremos de 4 V por gel.
- 5 - Vaciado de los huecos de los pocillos correspondientes a los sueros, y llenado con éstos. Manteniendo el gel en cámara húmeda, la carga se repite cada 30 minutos, 4-5 veces.
- 6 - Desarrollo de la reacción de inmunoprecipitación mediante incubación en cámara húmeda, durante 36 horas.
- 7 - Tefido de los geles con negro amido, y posterior secado en estufa a 37°C, durante 1-2 días.

4.3.2.5.2. Realización de la prueba (electroforesis - transferencia - inmunoreacción)

La separación inicial de proteínas se hizo mediante electroforesis en SDS-PAGE y condiciones reductoras, de la misma manera antes descrita para los análisis de perfiles proteicos (apartado 4.3.2.4).

Tras la electroforesis, las proteínas fueron transferidas a papel de nitrocelulosa de 0,22 μm (Pharmacia) en una cubeta Multiphor (Pharmacia), colocando, de ánodo a cátodo, 6 papeles Watman nº 1 embebidos en tampón de electrotransferencia (ver Tabla 16), la membrana de nitrocelulosa, el gel de resolución y 6 papeles más, empapados en el mismo tampón de transferencia. Procurando que no quedasen burbujas entre las distintas capas, la transferencia se llevó a cabo durante una noche, a 42 mA constantes.

Para el desarrollo de la reacción inmunoenzimática (Inmunoblot), primero se bloquearon las posibles reacciones inespecíficas en el papel de nitrocelulosa,

Tabla 16 - Soluciones empleadas en el estudio de antígenos.

<u>Transferencia</u>		<u>Inmunoreacción</u>	
Tampón de electrotransferencia (*)		Solución bloqueante	
Glicina	2,93 g	Leche descremada en polvo	5,0 g
Tris	5,81 g	PBS	100,0 ml
SDS	0,38 g	Solución de lavados	
Metanol	200,0 ml	Tween 20	0,1 ml
Agua destilada	800,0 ml	PBS	199,9 ml
(*) Recuperable; Almacenable a Tª ambiente.		Solución de sueros y conjugados	
		Leche descremada en polvo	2,0 g
		Tritón X-100	0,2 ml
		Tween 20	0,1 ml
		PBS	csp 200,0 ml
		Solución de revelado (**)	
		Solución A:	
		4-cloronaftol	0,03 g
		Metanol	10,0 ml
		Solución B:	
		Agua oxigenada	6,0 µl
		PBS	10,0 ml

(**) Ambas soluciones se preparan por separado; se añade la de metanol sobre la de PBS en el momento de su uso.

mediante la incubación del mismo, durante 6 horas, a 4°C, con solución bloqueante (ver Tabla 16). Tras lavar tres veces (10 minutos cada vez) con la solución de lavados (ver Tabla 16), se realizó la incubación con el suero hiperinmune correspondiente (diluido 1:3 en la solución de dilución; ver Tabla 16), durante 3 horas, en agitación, a temperatura ambiente. A continuación, tras otra serie de tres lavados, se procedió a la incubación con el conjugado (diluido a la concentración adecuada), durante 2 horas, a 37°C y en agitación. Tras lavar de nuevo tres veces, el inmunoblot se visualizó incubando el papel de nitrocelulosa con la solución de revelado (ver Tabla 16), en oscuridad, a temperatura ambiente y en agitación, hasta que las diferentes bandas se hicieran visibles. Después de lavar con agua destilada, el papel de nitrocelulosa se dejó secar al aire.

1

RESULTADOS

5. RESULTADOS

5.1. OBSERVACIONES PREVIAS

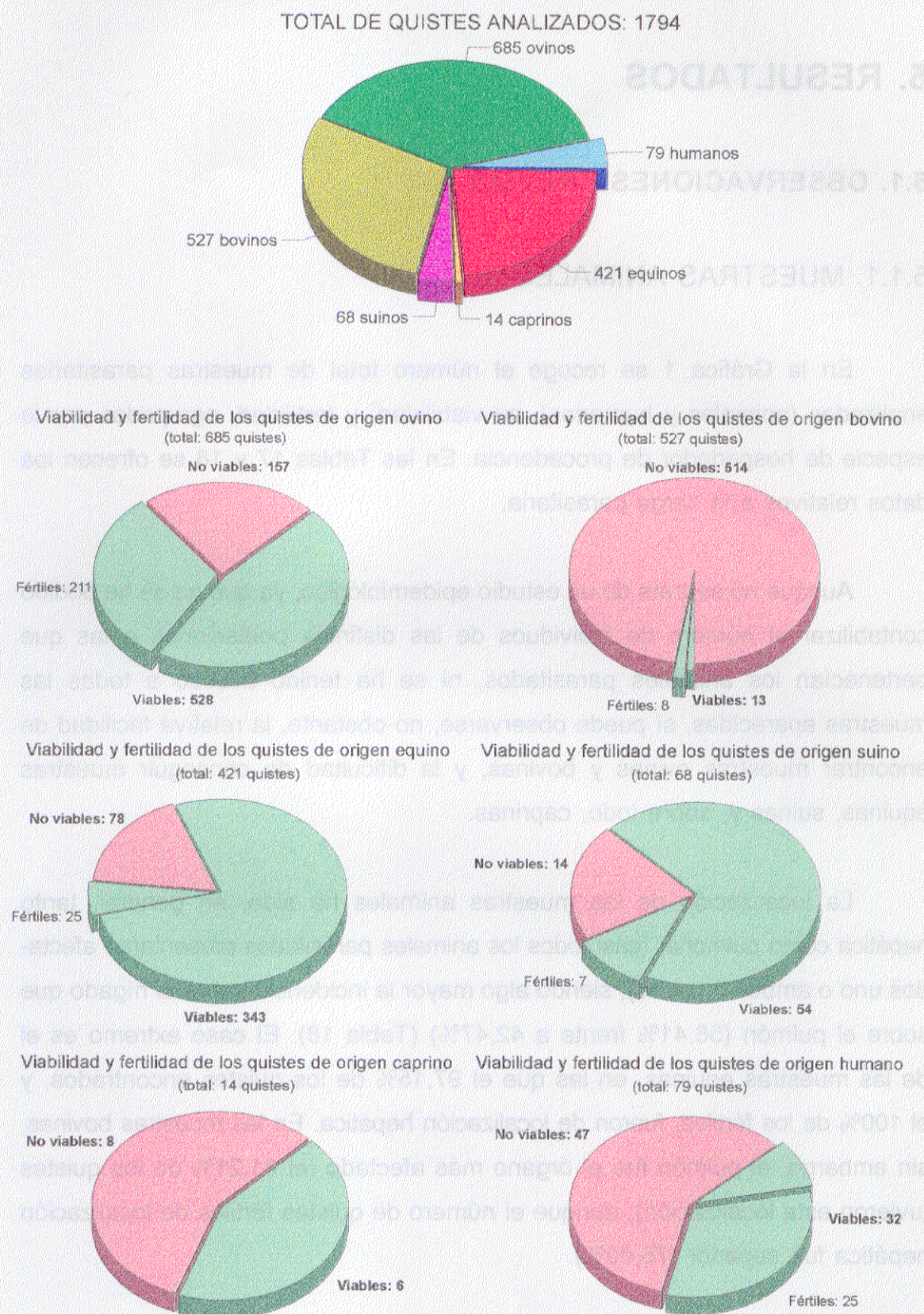
5.1.1. MUESTRAS ANIMALES

En la Gráfica 1 se recoge el número total de muestras parasitarias analizadas (animales y humanas), su viabilidad¹ y fertilidad, agrupadas por la especie de hospedador de procedencia. En las Tablas 17 y 18 se ofrecen los datos relativos a la carga parasitaria.

Aunque no se trata de un estudio epidemiológico, ya que no se ha podido contabilizar el número de individuos de las distintas poblaciones a las que pertenecían los animales parasitados, ni se ha tenido acceso a todas las muestras aparecidas, sí puede observarse, no obstante, la relativa facilidad de encontrar muestras ovinas y bovinas, y la dificultad de conseguir muestras equinas, suinas y, sobre todo, caprinas.

La localización de las muestras animales ha sido, en general, tanto hepática como pulmonar (casi todos los animales parasitados presentaron afectados uno o ambos órganos), siendo algo mayor la incidencia sobre el hígado que sobre el pulmón (56,41% frente a 42,47%) (Tabla 18). El caso extremo es el de las muestras equinas, en las que el 97,15% de los quistes encontrados, y el 100% de los fértiles, fueron de localización hepática. En las muestras bovinas, sin embargo, el pulmón fue el órgano más afectado (el 81,21% de los quistes tuvieron esta localización), aunque el número de quistes fértiles de localización hepática fue superior (75,00%).

(1) En la presente Memoria, se considera un quiste como viable cuando, independientemente de que haya o no desarrollado protoescolices y/o cápsulas prolíferas, presenta un líquido hidatídico transparente y una membrana parasitaria de aspecto macroscópico no alterado o degenerado. Se consideran los protoescolices como viables si están vivos y son morfológicamente normales.



Gráfica 1 - Número total, viabilidad y fertilidad de las muestras parasitarias (animales y humanas) analizadas, agrupadas por especie de hospedador.

Tabla 17 - Valores observados (totales) de carga parasitaria.

Especie de hospedador	Número de individuos parasitados	Total de quistes		Individuos con quistes viables (% del total)	Total de quistes	Quistes viables			Ind. con quistes viables y fértiles (% del total)	Total de quistes	Quistes viables	Quistes viables y fértiles		
		Número	Promedio (1) (rango)			Número	Promedio (1) (rango)	Promedio (2) (rango)				Número	Promedio (1) (rango)	Promedio (3) (rango)
OVINO	142	685	4,82 (1 - 20)	119 (83.80%)	635	528	3,72 (0 - 20)	4,44 (1 - 20)	106 (74.65%)	492	423	211	1,49 (0 - 18)	1,99 (1 - 18)
BOVINO	94	527	5,61 (1 - 26)	10 (10.64%)	34	13	0,14 (0 - 3)	1,30 (1 - 3)	6 (6.38%)	16	8	8	0,09 (0 - 2)	1,33 (1 - 2)
SUINO	26	68	2,62 (1 - 15)	17 (65.38%)	55	54	2,08 (0 - 15)	3,18 (1 - 15)	5 (19.23%)	8	7	7	0,27 (0 - 3)	1,40 (1 - 3)
CAPRINO	4	14	3,50 (1 - 6)	1 (25.00%)	6	6	1,50 (0 - 6)	6,00 (1 - 6)	0 (0.00%)	---	---	---	---	---
EQUINO	37	421	11,38 (1 - 162)	36 (97.30%)	415	343	9,27 (0 - 155)	9,53 (1 - 155)	7 (18.92%)	31	25	25	0,68 (0 - 8)	3,57 (1 - 8)
HUMANO	57	79	1,39 (1 - 9)	24 (30.38%)	44	32	0,56 (0 - 4)	1,33 (1 - 4)	19 (24.05%)	39	27	25	0,44 (0 - 4)	1,32 (1 - 4)
TOTAL	360	1794	4,98	207	1189	976	2,71	4,71	143	586	490	276	0,77	1,93

(1) Promedio del número de quistes considerados respecto al total de individuos parasitados.

(2) Promedio del número de quistes viables respecto al total de individuos portadores de quistes viables.

(3) Promedio del número de quistes viables y fértiles respecto al total de individuos portadores de los mismos.

Tabla 18 - Valores observados (por órgano) de carga parasitaria.

Especie de hospedador	Individuos con quistes hepáticos (% del total)	Quistes hepáticos			Individuos con quistes pulmonares (% del total)	Quistes pulmonares			Individuos con quistes de otras loc. (% del total)	Quistes de otras localizaciones		
		Total de quistes (promedio)	Quistes viables (promedio)	Quistes viables y fértiles (promedio)		Total de quistes (promedio)	Quistes viables (promedio)	Quistes viables y fértiles (promedio)		Total de quistes (promedio)	Quistes viables (promedio)	Quistes viables y fértiles (promedio)
OVINO	133 (93,01%)	403 (3,03)	317 (2,38)	128 (0,96)	119 (83,22%)	282 (2,37)	211 (1,09)	83 (0,70)	1 (0,07%)	1 (1,00)	1 (1,00)	1 (1,00)
BOVINO	28 (29,79%)	99 (3,54)	7 (0,25)	6 (0,21)	74 (78,72)	428 (5,78)	6 (0,08)	2 (0,03)	0 (0,00%)	---	---	---
SUINO	18 (69,23%)	49 (2,72)	37 (2,06)	6 (0,33)	9 (34,62%)	18 (2,00)	16 (1,78)	1 (0,11)	1 (3,85%)	1 (1,00)	1 (1,00)	0 (0,00)
CAPRINO	3 (75,00%)	8 (2,67)	3 (1,00)	0 (0,00)	2 (50,00%)	6 (3,00)	3 (1,50)	0 (0,00)	0 (0,00)	---	---	---
EQUINO	36 (97,30%)	409 (11,36)	340 (9,44)	25 (0,69)	2 (5,41%)	12 (6,00)	3 (1,50)	0 (0,00)	0 (0,00)	---	---	---
HUMANO	Quistes enteros	7 (12,28%)	8 (1,14)	3 (0,43)	2 (0,29)	3 (5,26%)	7 (2,33)	6 (1,67)	4 (7,02%)	8 (2,00)	5 (1,25)	2 (0,50)
	Quistes aspirados	34 (59,65%)	46 (1,35)	12 (0,35)	10 (0,29)	4 (7,02%)	4 (1,00)	3 (0,75)	5 (8,77%)	6 (1,20)	3 (0,60)	3 (0,60)
TOTAL	259 (71,94%)	1022 (3,87)	719 (2,78)	177 (0,68)	213 (59,17%)	757 (3,55)	248 (1,18)	94 (0,44)	11 (3,06%)	16 (1,45)	10 (0,91)	6 (0,54)

La suma del número de individuos parasitados, entre los 3 grupos considerados (quistes hepáticos, pulmonares y de otras localizaciones) puede ser mayor que el número total de individuos parasitados, debido a que los individuos con quistes en más de una localización se han contado en cada uno de los respectivos grupos a los que pudieran pertenecer.

Los promedios indicados son del número de quistes considerados (totales, viables, y viables y fértiles) en el órgano correspondiente, respecto al número de individuos hospedadores portadores de quistes en dicho órgano.

El aspecto externo de los quistes fue similar para las distintas muestras analizadas, excepto las equinas. El tamaño, en general, ha variado entre márgenes más o menos amplios, desde menos de 1 cm hasta (en algunos quistes bovinos) casi 20 cm de diámetro. Los quistes encontrados fueron en su mayoría uniloculares, con una membrana adventicia de grosor variable (<1 - 2 mm), siendo normalmente más delgada en los quistes pulmonares que en los hepáticos.

En las muestras ovinas (Figuras 12 a 14) no se encontró ninguna relación entre el tamaño del quiste y su viabilidad y fertilidad, presentándose quistes fértiles con tan sólo 2 cm de diámetro. En las muestras suinas, sólo entre los quistes grandes (de más de 5 cm de diámetro) se encontraron quistes fértiles. Las muestras bovinas presentaron, como característica común, un tamaño en general superior a los 3-4 cm de diámetro, con una membrana quística delgada, líquido hidatídico normalmente hialino, y con la membrana germinal de color amarillento, degenerada y/o caseificada (Figuras 16 y 17); los pocos quistes viables encontrados fueron de un tamaño entre 3 y 6 cm de diámetro, sin ninguna característica exterior aparente que los diferenciara de los no viables. Ningún quiste de origen caprino ha superado los 2 cm de diámetro, ni ha sido fértil.

En el caso de las muestras equinas, se pudieron observar dos tipos diferentes de infestaciones: en la mayoría de los casos se trataba de quistes unicamerales de pequeño tamaño (en general, menor de 1 - 2 cm), o pluricamerales de tamaño variable (hasta 10 cm), ocasionalmente muy abundantes, con membranas quísticas delgadas, y siempre sin protoescólices (Figura 18). Sin embargo, también pudieron observarse hígados (nunca pulmones) parasitados por un número relativamente pequeño de quistes (entre 1 y 8), de gran tamaño (entre 4 y 10 cm de diámetro), y con una membrana quística muy gruesa (Figura 19); fueron únicamente este tipo de quistes, y en el 100% de los casos, los que presentaron protoescólices y/o cápsulas.

En la arena hidatídica también se han encontrado diferencias en las muestras equinas respecto a los quistes procedentes de otros hospedadores. Mientras que en las muestras ovinas, bovinas y suinas la arena fue de color blancuzco, formada por protoescólices y cápsulas prolíferas (Figura 15), en los quistes equinos presentó siempre un color pardo oscuro, estando formada mayoritariamente por cápsulas prolíferas, junto con las cuales podían observarse abundantes cuerpos calcáreos, de forma irregular y de pequeño tamaño (en torno a los 10 - 50 μm de diámetro); algunas cápsulas, además, contenían casi exclusivamente restos de protoescólices y gran cantidad de cuerpos calcáreos (Figura 20). Estas estructuras alargaron considerablemente el tiempo necesario para realizar la digestión péptica, debido a la elevación del pH que provocaban.

La cantidad de protoescólices presentes en los distintos quistes ha sido variable, así como la viabilidad de los mismos. En las muestras ovinas se han presentado todas las posibles situaciones, desde pocos protoescólices, y muertos, hasta un gran número de los mismos, y con un porcentaje de viabilidad superior al 80%. Las muestras bovinas, cuando han sido fértiles, presentaban en general pocos protoescólices, con un porcentaje de viabilidad en torno al 50-80%. Las muestras suinas fueron intermedias a las ovinas y bovinas. Las equinas presentaron siempre una gran cantidad de protoescólices, con un porcentaje de viabilidad por encima del 80%.

5.1.2. MUESTRAS HUMANAS

Las localizaciones principales han sido hígado (68,35%) y pulmón (13,92%), habiéndose obtenido también quistes renales, en bazo y en cavidad intestinal (como infestaciones primarias o a consecuencia de siembras peritoneales tras operaciones anteriores) (en total, 10,13%). El 7,59% restante ha correspondido a quistes cuya localización no fue facilitada por los cirujanos, siendo en tal caso clasificados como *indeterminados*.

Sólo en el 29,11% de las ocasiones pudo obtenerse el quiste entero (Tabla 18, Figura 21); en la mayoría de los casos, por condicionantes quirúrgicos, únicamente fue extraído (aspirado) el contenido quístico, alguna vez acompañado de las membranas laminar y germinal. En aquellos casos en que se consiguieron quistes enteros, el tamaño de los mismos osciló entre 2 a 15 cm. de diámetro. Todos fueron quistes uniloculares, con una membrana adventicia similar, en las muestras pulmonares, a la observada en las muestras animales (ovinas, bovinas y suinas); sin embargo, en los casos de localización no pulmonar, dicha membrana fue siempre muy gruesa.

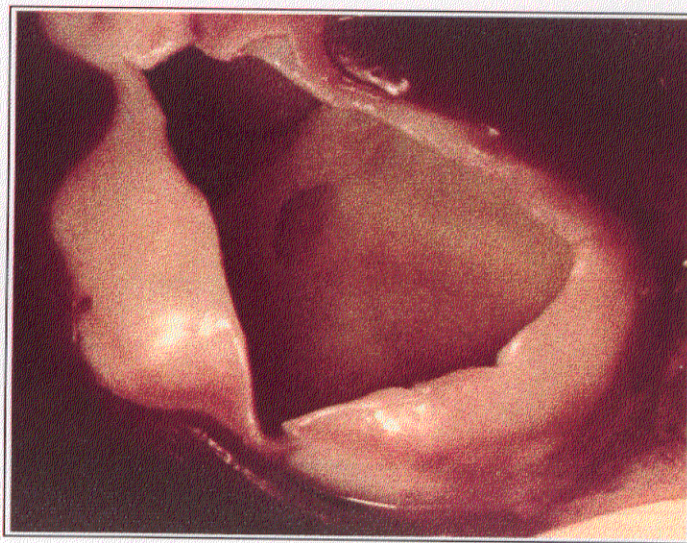
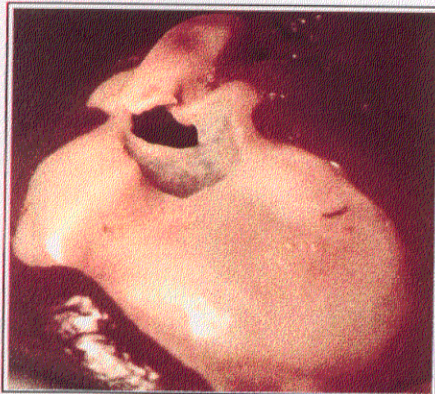
La viabilidad y fertilidad de las muestras fue variable (Tabla 18); casi el 40% de los quistes enteros estaban degenerados, presentando un interior contaminado, a veces pastoso, con abundantes restos de membranas y/o de quistes hijos (ver Figuras 22 a 26). De los viables, sólo el 64,29% fueron quistes fértiles.

En el caso de los aspirados, la no existencia de arena hidatídica, o su presencia en muy poca cantidad, pudo ser debida a su no obtención en el aspirado, no necesariamente a la infertilidad (o a la baja fertilidad) del quiste. De las muestras que presentaron quistes hijos y/o arena hidatídica, un 51,52% de las mismas estuvieron muertas o degeneradas, bien por causas naturales, por contaminación con sangre o con bilis, o porque entraron en contacto con soluciones esterilizantes (suero hipertónico, agua oxigenada, formalina, etc.) durante la extracción o el almacenamiento previo a la recogida.

De un total de 46 muestras fértiles (entre quistes enteros y aspirados), sólo 25 presentaron protoescólices vivos. En todos estos casos, la arena fue de color blancuzco, formada tanto por protoescólices libres como por cápsulas prolíferas. El número de protoescólices por quiste fue variable, siendo en ocasiones insuficiente para realizar ninguna experiencia, salvo análisis morfométricos.



Figura 12 - Quiste hepático procedente de una oveja sacrificada en el matadero municipal de Madrid.



Figuras 13 y 14 - El mismo quiste anterior, abierto. Se observa la presencia de arena hidatídica, de color blanquecino.

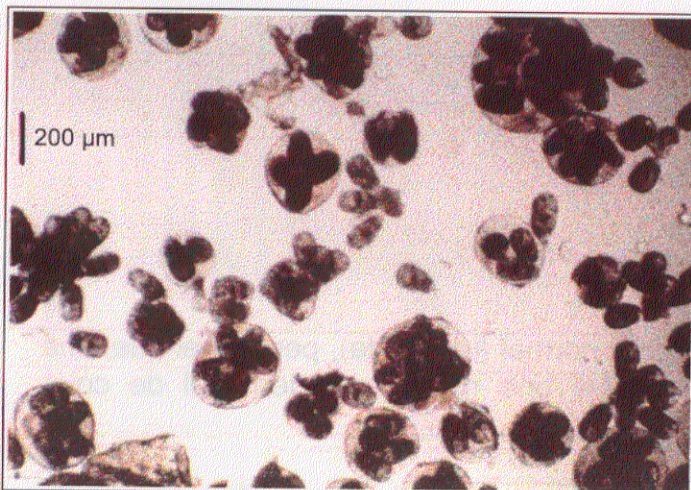


Figura 15 - Detalle de la arena hidatídica obtenida del quiste de las figuras anteriores. Hay presentes cápsulas prolíferas y protoescolices libres.

Muestras de origen bovino.

Figura 16 - Quiste pulmonar, de aspecto normal (izquierda), pero en el que, una vez abierto (derecha), se observa una membrana germinal de color amarillento.

Figura 17 - Quistes pulmonares abiertos, mostrando el aspecto degenerado de la membrana germinal. No obstante, en ambos casos el líquido hidatídico es hialino.

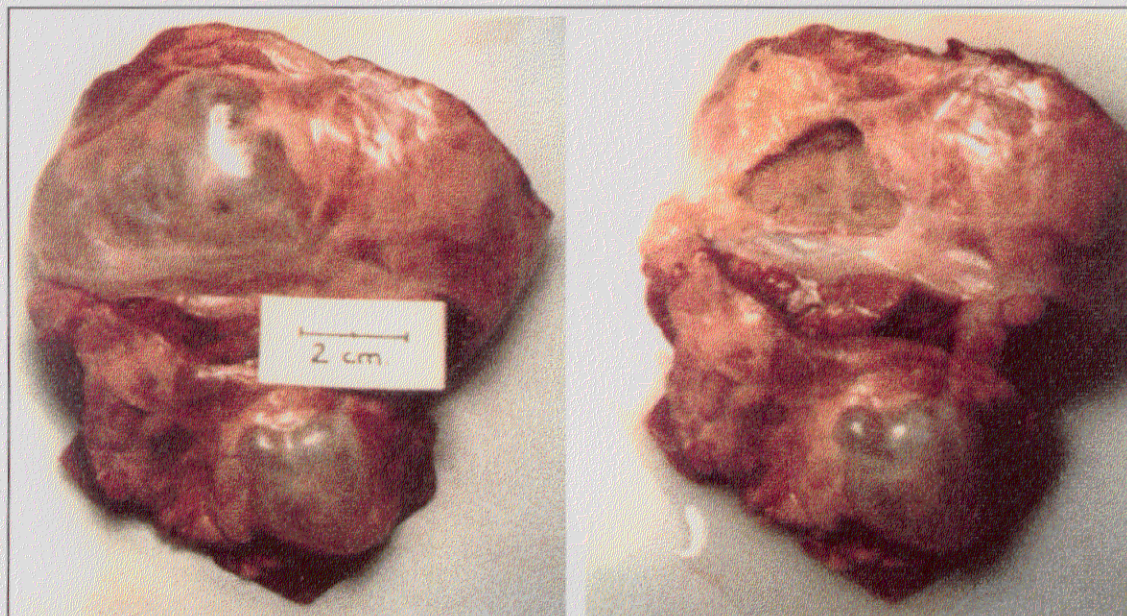


Figura 16

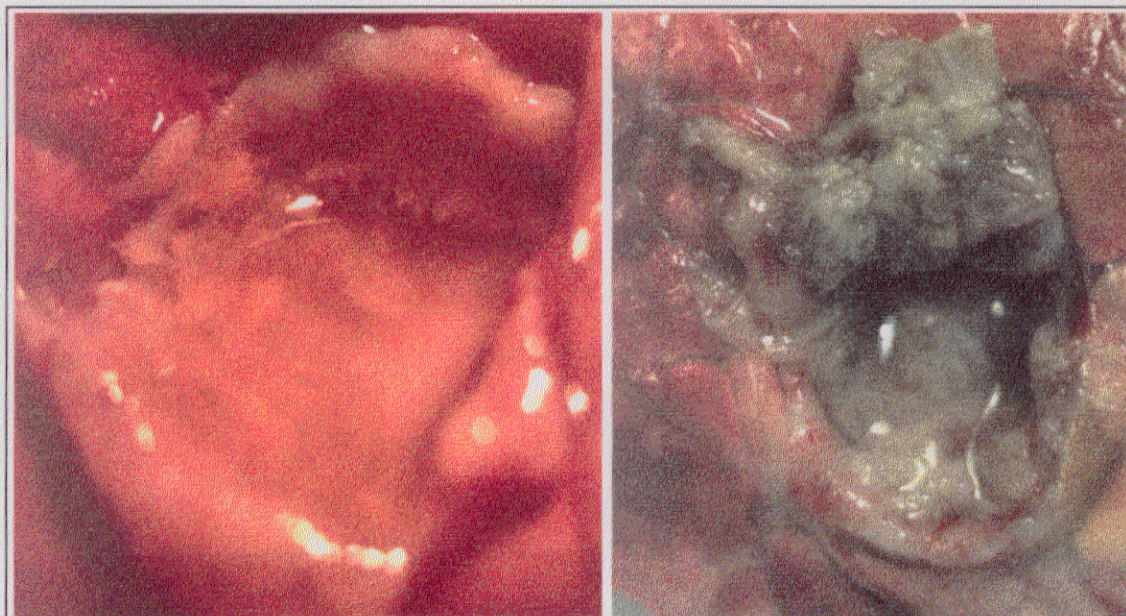


Figura 17

Muestras de origen equino.

Figura 18 - Infestación hepática abundante, por quistes de pequeño tamaño, aislados o en racimos, de pared quística delgada, y todos estériles.

Figura 19 - Infestación hepática por quistes de gran tamaño, con una pared quística muy gruesa, y todos fértiles, con arena hidatídica de color pardo oscuro.

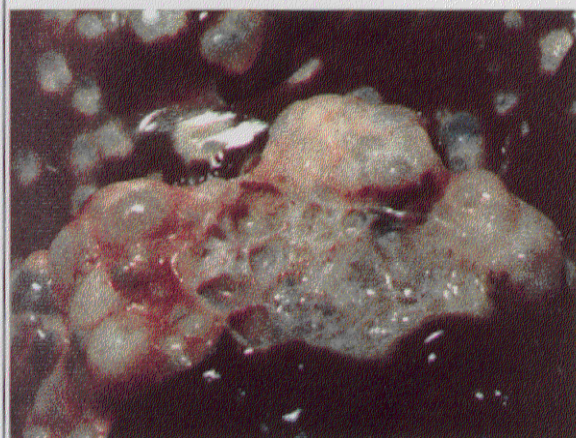
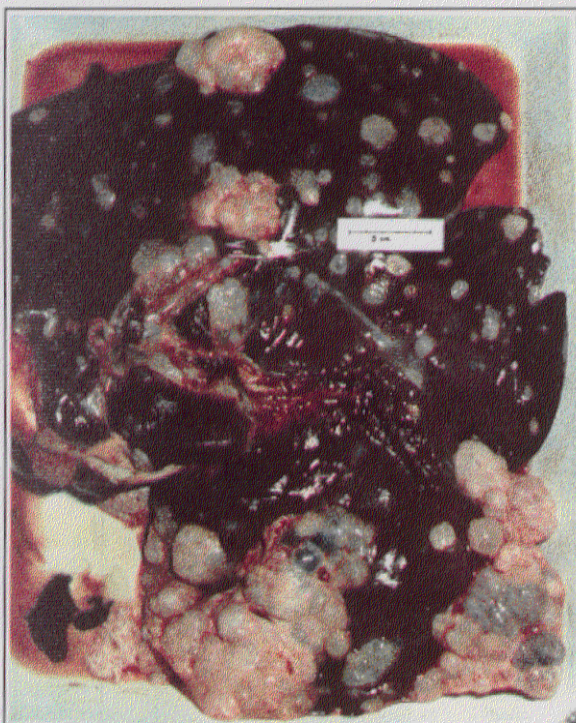


Figura 18

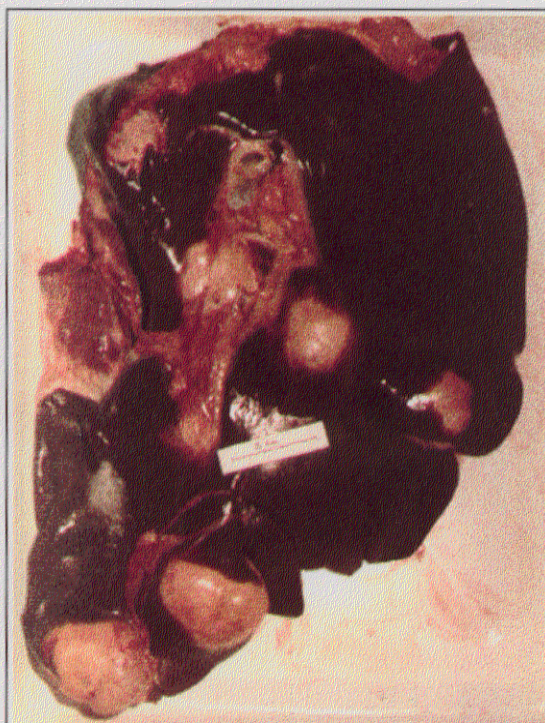


Figura 19

Area histológica oscura de células oscuras

Figura 20 - Area formada por células proliferas con algun protosolista (ver cuerpo calcáreo (imagen superior). Algunas células proliferas contienen oscuramente (ver de protosolista) y numerosas células calcáreas (imagen inferior).

Arena hidatídica obtenida de quistes equinos.

Figura 20 - Arena formada por cápsulas prolígeras, con algún protoescólex libre, y cuerpos calcáreos (imagen superior). Algunas cápsulas prolígeras contienen únicamente restos de protoescólices, y numerosos cuerpos calcáreos (imágenes inferiores).

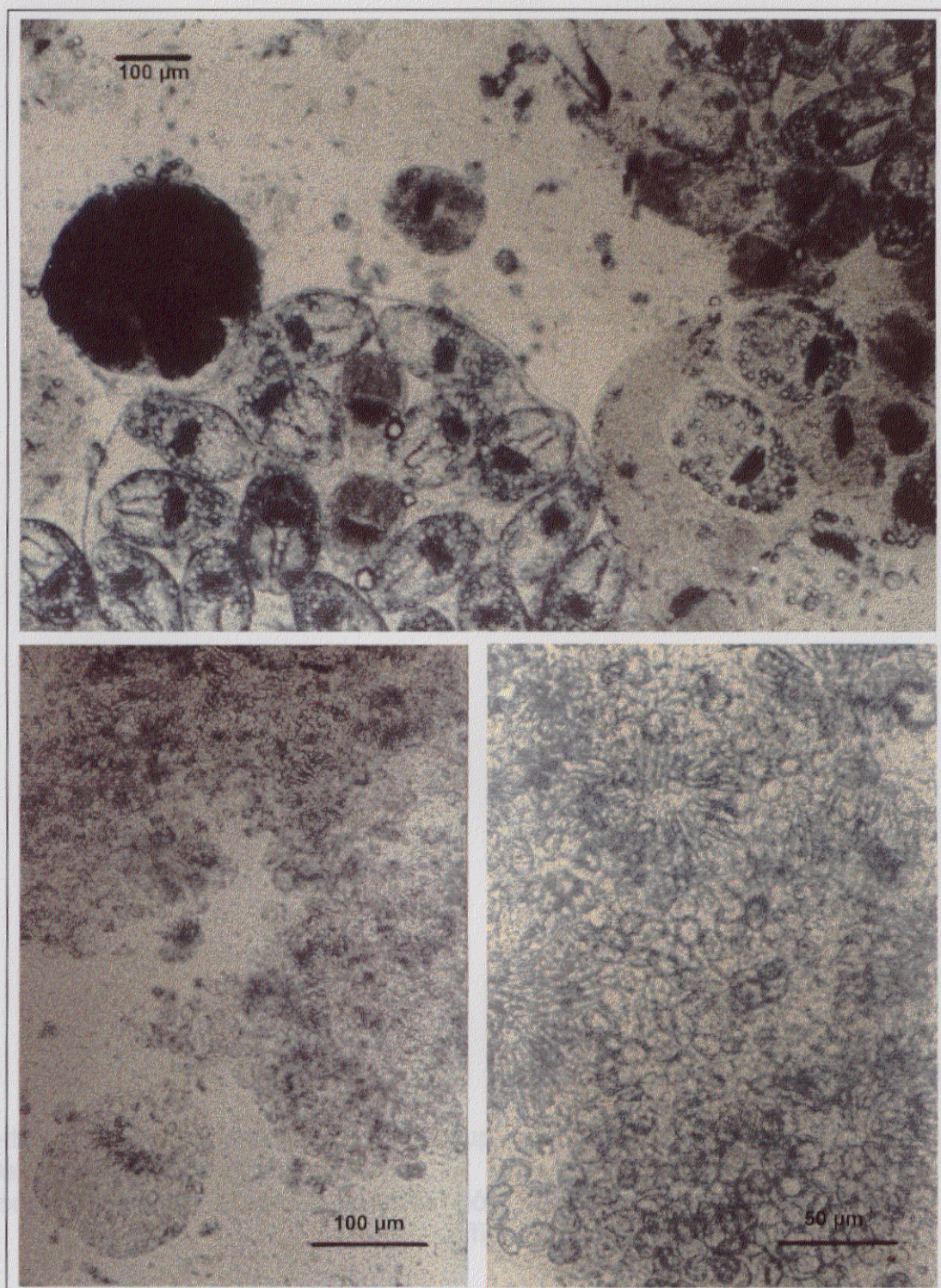


Figura 20

Muestra de origen humano.

Figura 21 - Extracción quirúrgica de un quiste hidatídico adherido a asas intestinales. El paciente (una niña de 13 años) era asintomático, siendo el quiste detectado en una exploración realizada por otros motivos. No hubo tratamiento quimioterápico específico previo.

Figura 22 - El quiste de la Figura 21, abierto. La membrana del parásito, de color blanco, tiene un aspecto normal; sin embargo, el líquido hidatídico presenta un aspecto turbio.

Figura 23 - Arena hidatídica obtenida del quiste de las figuras anteriores. Puede observarse que la mayoría de los protoescolices están degenerados y/o presentan alteraciones respecto a la morfología normal.

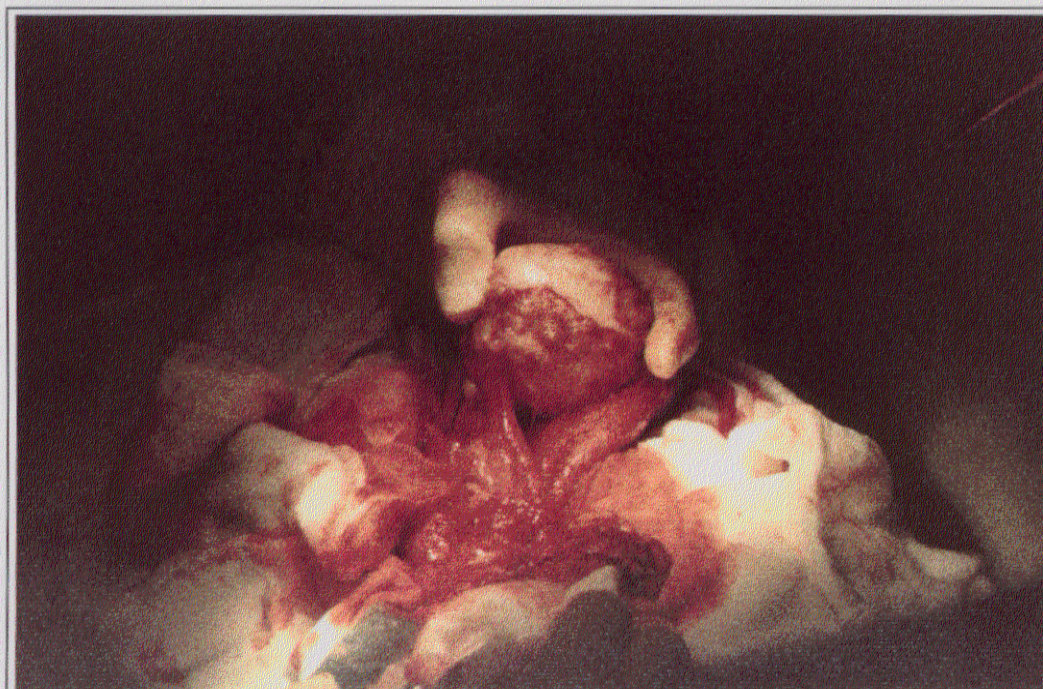


Figura 21

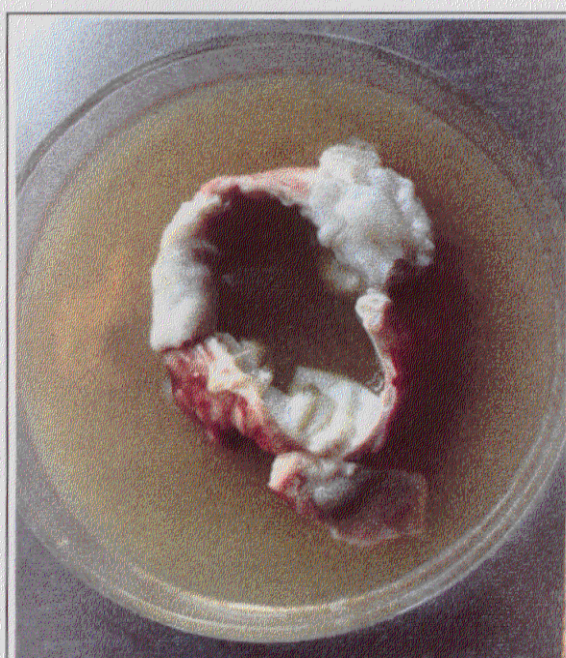


Figura 22

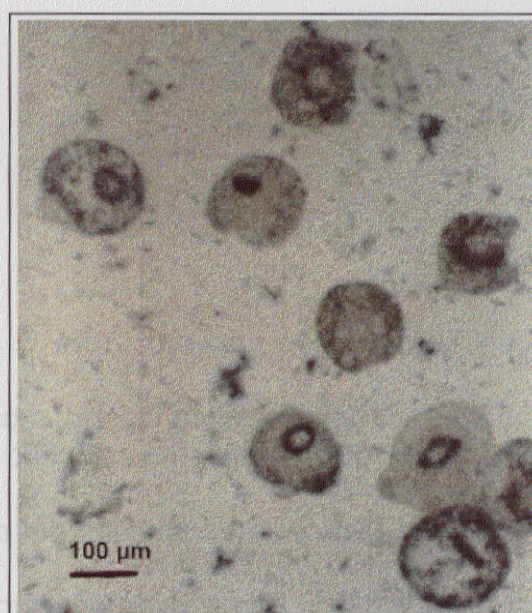


Figura 23

Muestras de origen humano.

Figura 24 - Quiste hepático abierto, mostrando su contenido, formado por numerosos quistes hijos de pequeño tamaño, y restos de membranas.

Figura 25 - Detalle del contenido del quiste de la Figura 24.

Figura 26 - Quiste hepático de aspecto externo normal (izquierda), pero con un contenido de consistencia gelatinosa y contaminado con sangre (derecha).

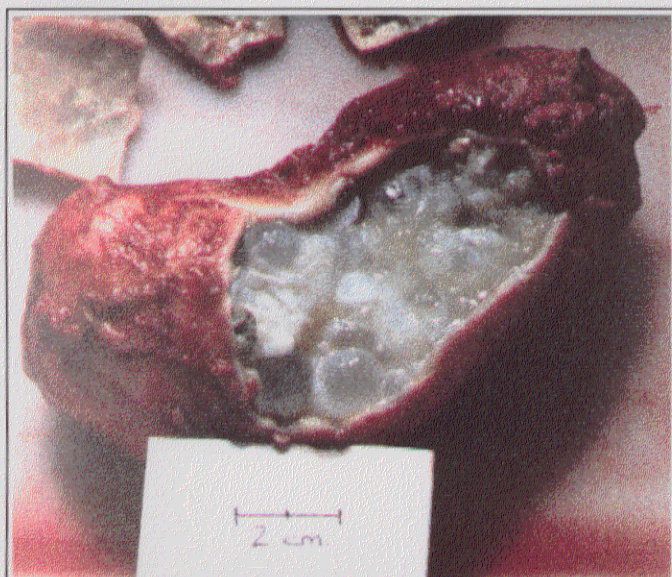


Figura 24



Figura 25

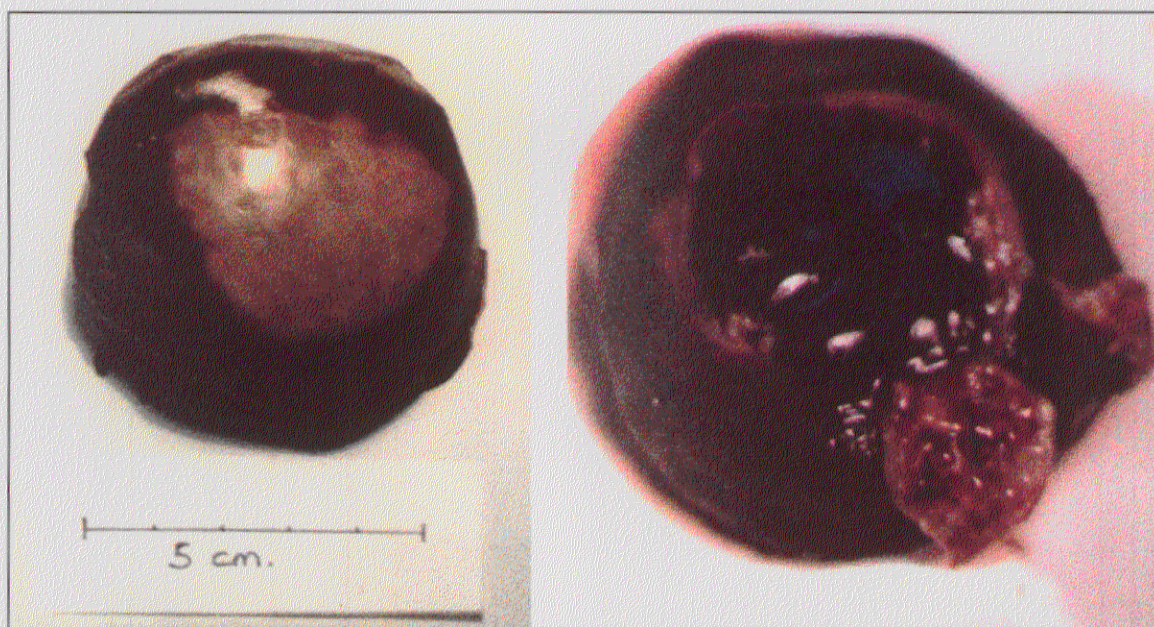


Figura 26

5.2. ESTUDIOS DE CARACTERIZACIÓN DE LAS CEPAS DEL PARÁSITO

5.2.1. PRUEBAS *IN VITRO*

5.2.1.1. Cultivos en dirección vesicular

5.2.1.1.1. Desarrollos en dirección vesicular

Los tiempos observados en los distintos cultivos, para el desarrollo de microquistes, vienen recogidos en la Tabla 19 y en las Gráficas 2 a 7. El desarrollo de los distintos individuos de un mismo cultivo no fue nunca simultáneo, pudiéndose encontrar representadas, en un momento dado, las distintas fases de desarrollo. Los tiempos indicados corresponden a los obtenidos por los individuos más avanzados de cada cultivo.

Tabla 19 - Tiempos observados de desarrollo vesicular, para las distintas muestras, agrupadas por especie de hospedador de procedencia.

Grupo de muestras	Inicio de la vesiculización	Aparición de premicroquistes	Formación de microquistes
Ovinas	3 (2 - 6)	16 (8 - 20)	29 (19 - 37)
Bovinas	2 (1 - 3)	15 (13 - 18)	
Suinas*	2 (1 - 2)	8 (6 - 12)	13 (9 - 18)
Equinas	2 (1 - 4)	14 (7 - 21)	43 (35 -)
Humanas	3 (1 - 4)	12 (8 - 15)	29 (24 - 38)

Se indican, en días, el tiempo promedio (redondeado) y el rango de tiempos observados para alcanzar una fase determinada.

(*) No se consideran, para el tiempo de formación de microquistes, dos cultivos en los que los tiempos fueron muy altos (43 y 78 días) y en los que se observó el desarrollo de individuos segmentados.

En todas las experiencias aparecieron individuos evaginados espontáneamente, en una proporción variable entre <1-30%, según el caso. Estos individuos, móviles al principio, fueron paulatinamente perdiendo la movilidad y siguiendo un proceso vesicular similar al observado en los protoescólices invaginados.

El proceso de desarrollo (Figuras 27 a 34) ha sido tanto por vacuolización interna como por vesiculización externa, presentándose ambos tipos en casi todos los cultivos. Aunque en algunos casos uno de estos procesos predominase sobre el otro, en general ambos se dieron con igual importancia, salvo en las muestras equinas, en las que el desarrollo por endovesiculización fue la forma preferente de evolución hacia microquistes.

El número de protoescólices que llegaron a formar microquistes fue siempre muy pequeño, en comparación con el número total de individuos del cultivo: en ningún caso se superó el 15%, tras periodos de hasta 50 días, siendo lo más normal entre el 1-10%. Como es lógico, cuanto más tiempo se mantuvieron los cultivos, más microquistes se obtuvieron, no observándose diferencias entre las distintas muestras (salvo las equinas) en el número de microquistes formados, o en su tamaño. En el caso de las muestras equinas, y dado su desarrollo más lento (ver más adelante), el número de microquistes obtenidos no llegó en ocasiones ni siquiera al 1%.

El desarrollo más rápido ha correspondido a las muestras suinas (Gráficas 2 y 7). Sólo en una experiencia no se pudo completar el desarrollo, por degeneración y muerte de los protoescólices al cabo de 20 días. En los demás casos, ya a las 12 horas de cultivo aparecieron individuos de aspecto redondeado, o con pequeñas exovesículas. El aumento en el tamaño de éstas, o en el grado de vacuolización, progresó rápidamente, detectándose premicroquistes entre los

6-12 días de cultivo. La formación de microquistes se constató, en general, hacia los 10-15 días; sin embargo, en dos ocasiones no se obtuvieron microquistes sino hasta los 43 y 78 días de cultivo. En estos dos casos, más en un tercero en que el desarrollo de microquistes fue acorde con los tiempos indicados, se observó también la formación de individuos segmentados (ver más adelante, 5.2.1.1.2. *Desarrollos en dirección estrobilar*).

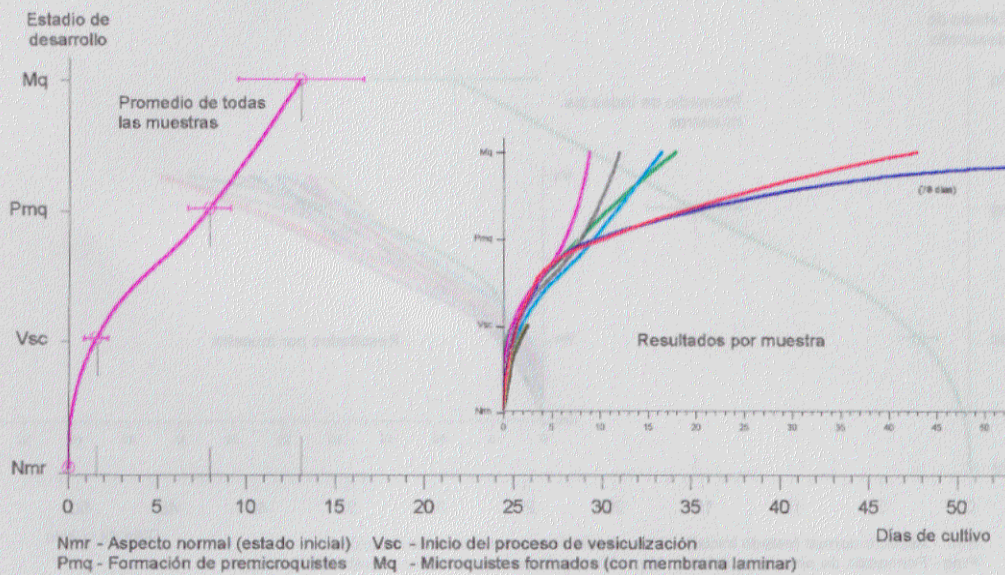
Las muestras equinas han sido las que han presentado el desarrollo vesicular más lento de todos los observados (Gráficas 3 y 7). En 6 ocasiones no se consiguió constatar la presencia de microquistes tras 45-50 días de cultivo; en los demás casos se necesitaron entre 35 y 47 días para que dicho desarrollo se completara. En general, la evolución en los diferentes cultivos fue similar, iniciándose el desarrollo a los 1-4 días, y formándose premicroquistes entre 7 y 21 días (en general, en torno a los 11-19 días). En este estadio el desarrollo se ralentizó, demorándose la formación de microquistes hasta la 7ª-8ª semana de cultivo.

Respecto a las muestras ovinas (Gráfica 4), el inicio del desarrollo vesicular se inició, en la mayoría de los casos, entre los 2-4 días de cultivo, aunque pudo demorarse hasta los 6 días. El proceso de vesiculización continuó hasta que, al cabo de entre 8 y 20 días (en la mayoría de los cultivos, entre 12 y 17 días), se empezaron a formar premicroquistes. Salvo en 4 casos, en que los cultivos degeneraron, en los demás se detectó la formación de microquistes entre los 25-37 días, pudiendo ser incluso algo más rápido en algunos cultivos (sólo 19 días). Al igual que con las muestras suinas, en dos ocasiones también se desarrollaron individuos segmentados (ver 5.2.1.1.2. *Desarrollos en dirección estrobilar*), no observándose en tales casos la formación de microquistes sino hasta los 33-47 días de cultivo.

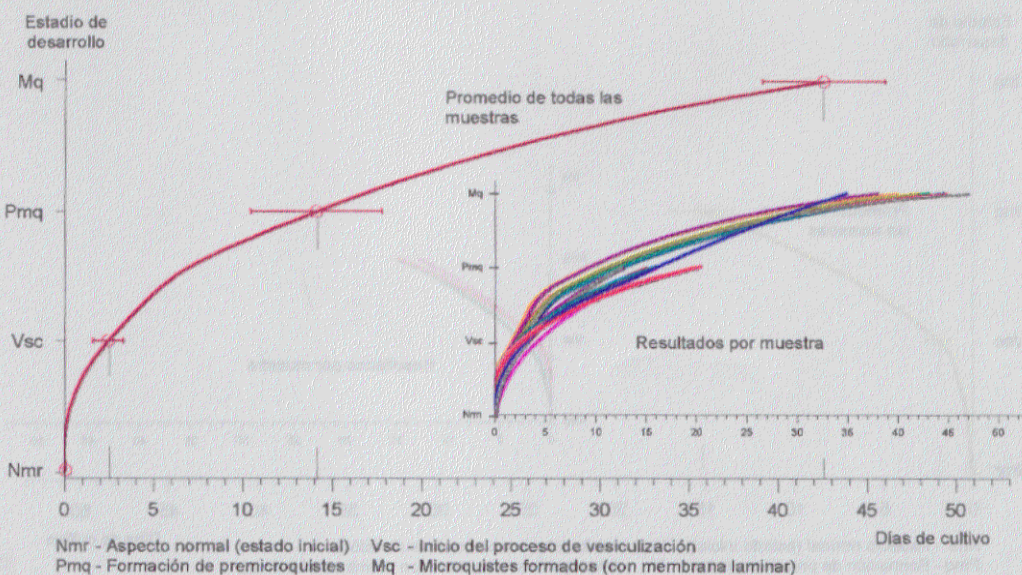
En el caso de las muestras bovinas analizadas (Gráfica 5), aunque su desarrollo inicial fue normal (inicio de vesiculización a los 1-3 días, premicroquistes entre 13-18 días), en ninguna ocasión pudo constatarse de forma fehaciente la formación de microquistes, degenerando los distintos cultivos entre los 28-45 días. Sólo en uno de ellos se observó el engrosamiento de la pared del premicroquiste, pero sin que se presentara la estructura típica de la membrana laminar.

Las muestras humanas han seguido un patrón similar al de las muestras ovinas (Gráficas 6 y 7). El inicio del desarrollo vesicular se observó a los 1-4 días de cultivo, formándose premicroquistes entre los 8-15 días. Salvo en dos experiencias, en que la degeneración de los cultivos impidió completar el desarrollo, en los demás casos se formaron microquistes entre los 24-38 días.

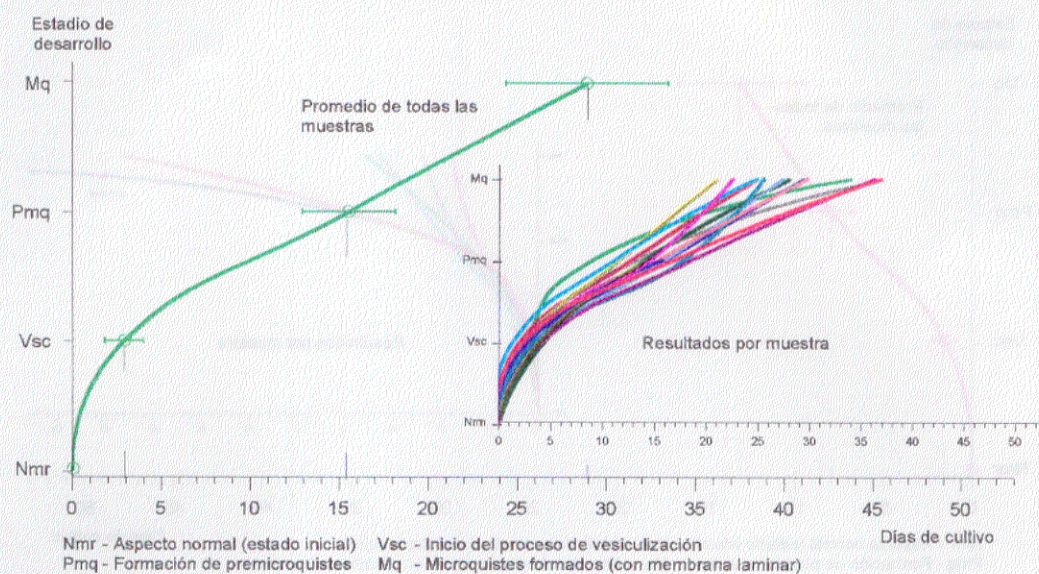
Gráfica 2 - Desarrollo vesicular *in vitro* - evolución según los estadios de desarrollo considerados. Muestras suínas.



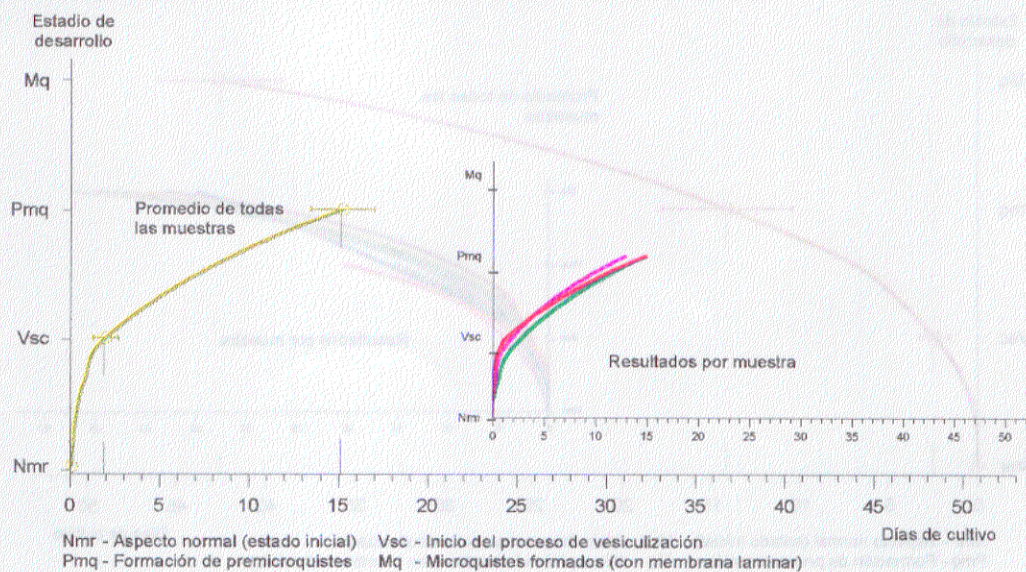
Gráfica 3 - Desarrollo vesicular *in vitro* - evolución según los estadios de desarrollo considerados. Muestras equinas.



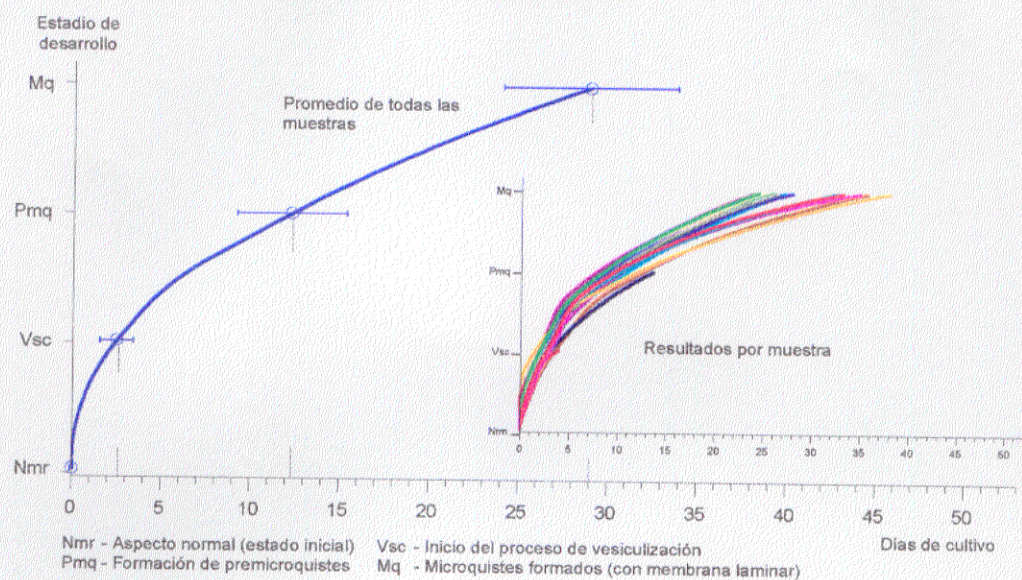
Gráfica 4 - Desarrollo vesicular *in vitro* - evolución según los estadios de desarrollo considerados. Muestras ovinas.



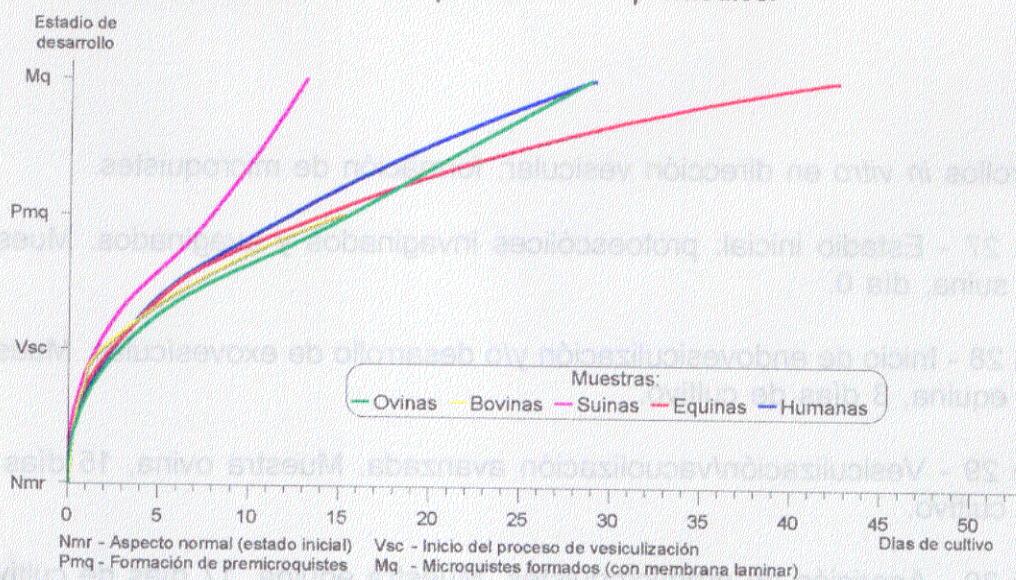
Gráfica 5 - Desarrollo vesicular *in vitro* - evolución según los estadios de desarrollo considerados. Muestras bovinas.



Gráfica 6 - Desarrollo vesicular *in vitro* - evolución según los estadios de desarrollo considerados. Muestras humanas.



Gráfica 7 - Desarrollo vesicular *in vitro* - evolución según los estadios de desarrollo considerados. Comparación entre promedios.



Desarrollos *in vitro* en dirección vesicular: formación de microquistes.

Figura 27 - Estadio inicial: protoescólices invaginados y evaginados. Muestra suina, día 0.

Figura 28 - Inicio de endovesiculización y/o desarrollo de exovesículas. Muestra equina, 3 días de cultivo.

Figura 29 - Vesiculización/vacuolización avanzada. Muestra ovina, 15 días de cultivo.

Figura 30 - Aparición de premicroquistes. Muestra equina, 17 días de cultivo.

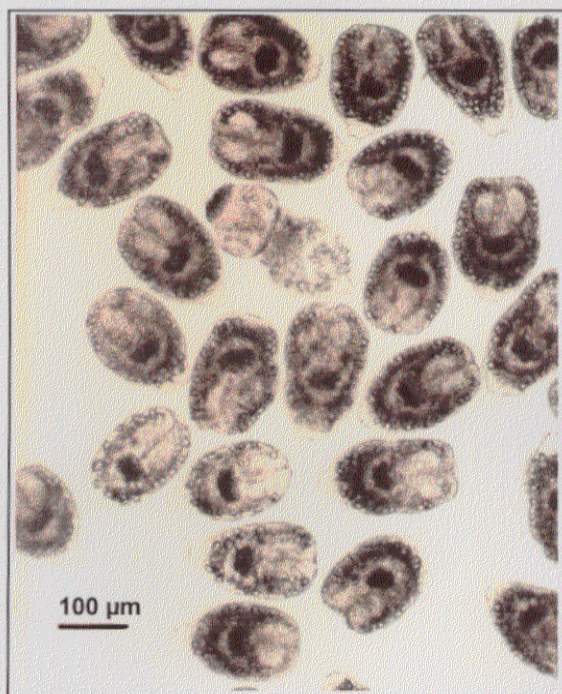


Figura 27

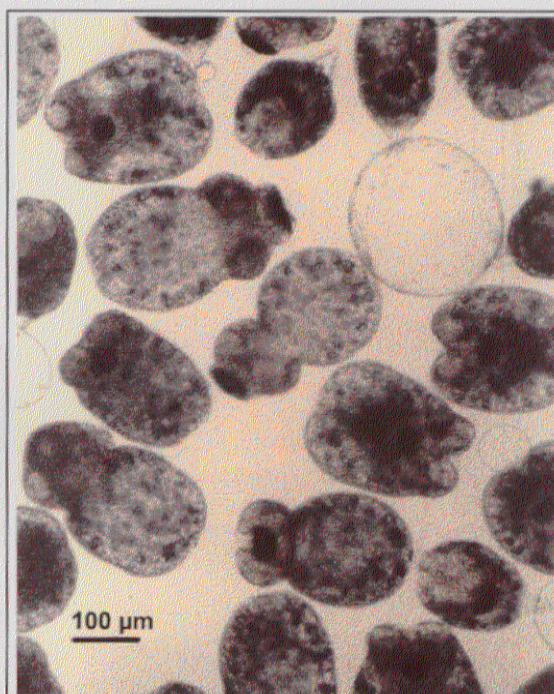


Figura 28

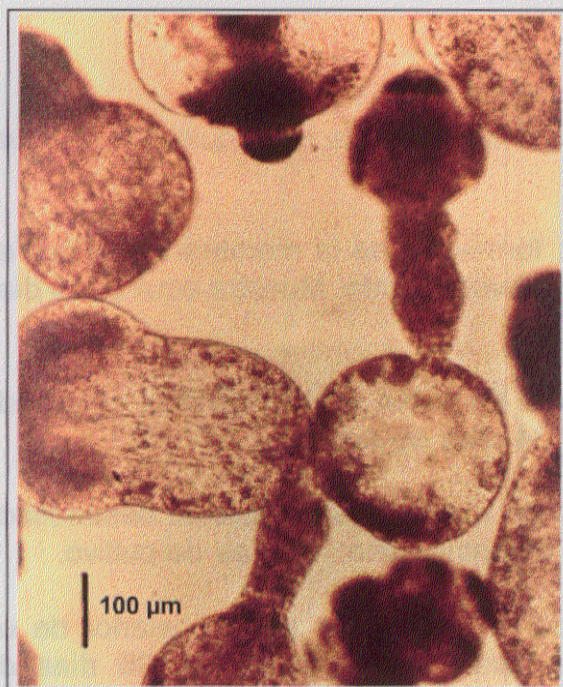


Figura 29

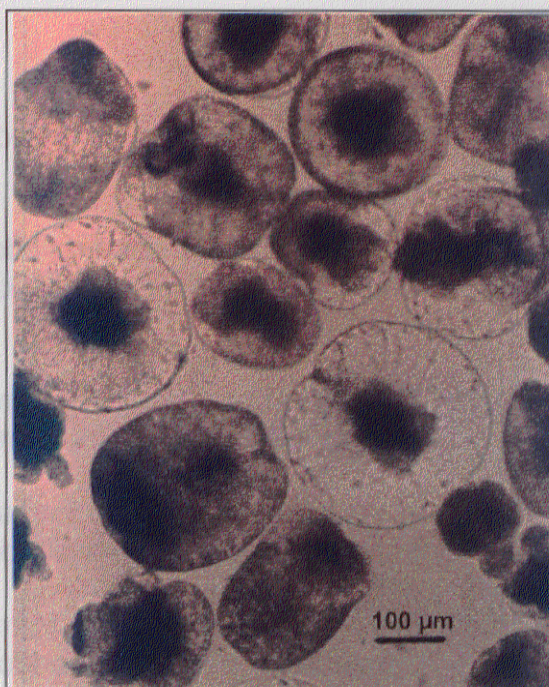


Figura 30

Desarrollos *in vitro* en dirección vesicular: formación de microquistes (continuación).

Figura 31 - Microquistes desarrollados: formación de la membrana laminar en torno a un individuo invaginado endovesiculante. Muestra equina, 49 días de cultivo.

Figura 32 - Membrana laminar formada en torno a un individuo evaginado endovesiculante. Muestra ovina, 34 días de cultivo.

Figura 33 - Membrana laminar formada en torno a la exovesícula desarrollada por un protoescólex invaginado. Muestra suina, 16 días de cultivo.

Figura 34 - Membrana laminar formada en torno a la parte posterior de un protoescólex evaginado endovesiculante. Muestra ovina, 26 días de cultivo.

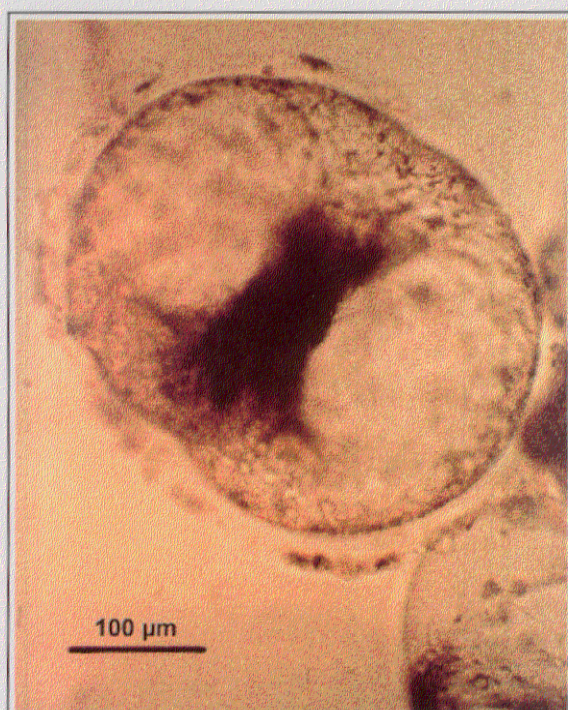


Figura 31

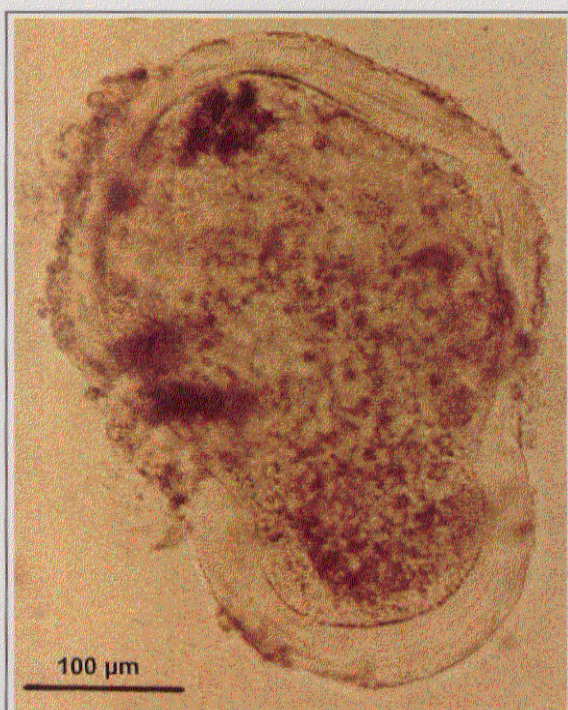


Figura 32

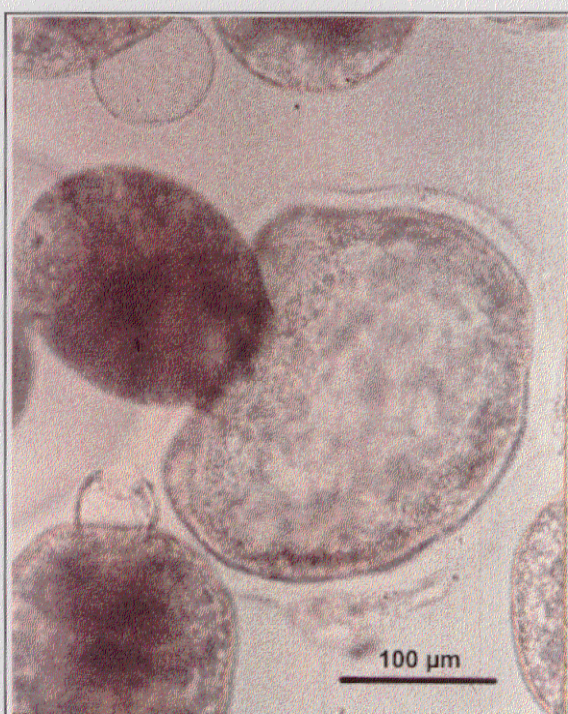


Figura 33

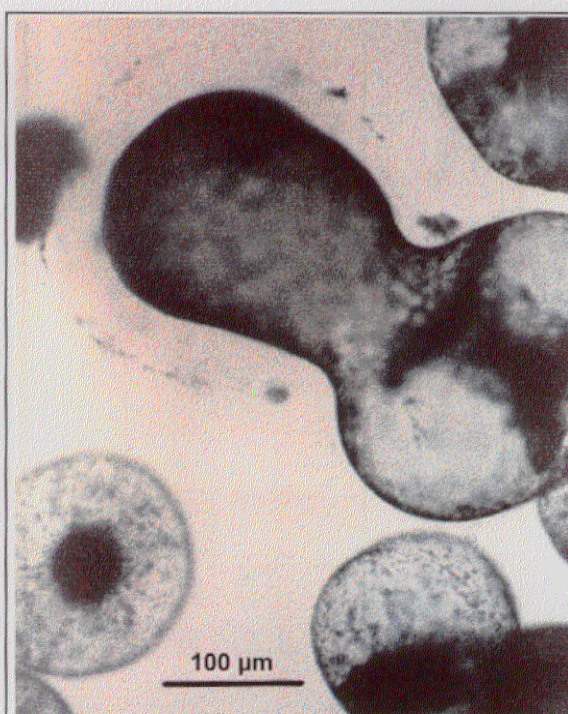


Figura 34

5.2.1.1.2. Desarrollos en dirección estrobilar

En varios cultivos de muestras ovinas y suinas se observó el desarrollo de algunos protoescólices hacia individuos segmentados, en distintos tiempos y grado de desarrollo, dependiendo de cada caso (Tabla 20; Gráficas 8 y 10). A la vez que dicho desarrollo tuvo lugar, la evolución hacia microquistes, en general, se ralentizó (Gráfica 9 y 11).

Respecto a las muestras ovinas, este desarrollo se obtuvo en dos ocasiones. En ambas experiencias, el número de protoescólices invaginados fue muy elevado (>80%) durante casi todo el tiempo de cultivo. La evolución hacia microquistes siguió inicialmente el patrón descrito anteriormente para las muestras ovinas (inicio del proceso en 2-4 días, premicroquistes en 12-15 días), desarrollándose inicialmente por endovesiculización; a partir de los 20-25 días de cultivo, el número de exovesículas fue poco a poco en aumento, llegando

Tabla 209 - Desarrollo observado en dirección estrobilar en varios cultivos monofásicos (vesiculares).

Muestra	Formación de microquistes (días)	Aparición del primer segmento (días)	Número de individuos en desarrollo estrobilar	Máximo desarrollo estrobilar alcanzado
OV1	33 d.	38 d.	1 individuo	1 segmento
OV2	47 d.	52 d.	1 individuo	1 segmento
CE1	43 d.	45 d.	>10 individuos	3 segmentos, testículos
CE2	10 d.	73 d.	1 individuo	1 segmento
CE3	78 d.	29 d.	>70%	3 segmentos, testículos, poro genital, cirro

a ser formadas por hasta el 70% de los protoescólices. Al cabo de 33 días en una experiencia, y de 47 días en la otra, se formaron microquistes (Gráfica 9).

Paralelamente a este desarrollo vesicular, en cada cultivo uno de los protoescólices evaginados creció significativamente (Figura 35), si bien a un ritmo mucho más lento que el obtenido en los cultivos en dirección estrobilar realizados con protoescólices de las mismas muestras (Gráfica 8). La presencia de bandeo en el estróbilo se observó en cada caso a los 35 y 42 días, formándose completamente el septo a los 38 y 47 días (Figura 36). Sin embargo, poco después (días 45 y 61) ambos individuos empezaron a degenerar hacia procesos de vesiculización.

En las muestras suinas que presentaron este desarrollo, éste fue heterogéneo, tanto por el estadio evolutivo alcanzado en cada caso, como por el tiempo requerido para ello: desde un único individuo segmentado, a los 73 días de cultivo, hasta más del 70% de los protoescólices desarrollándose hacia adultos, llegándose hasta la formación de testículos y poro genital.

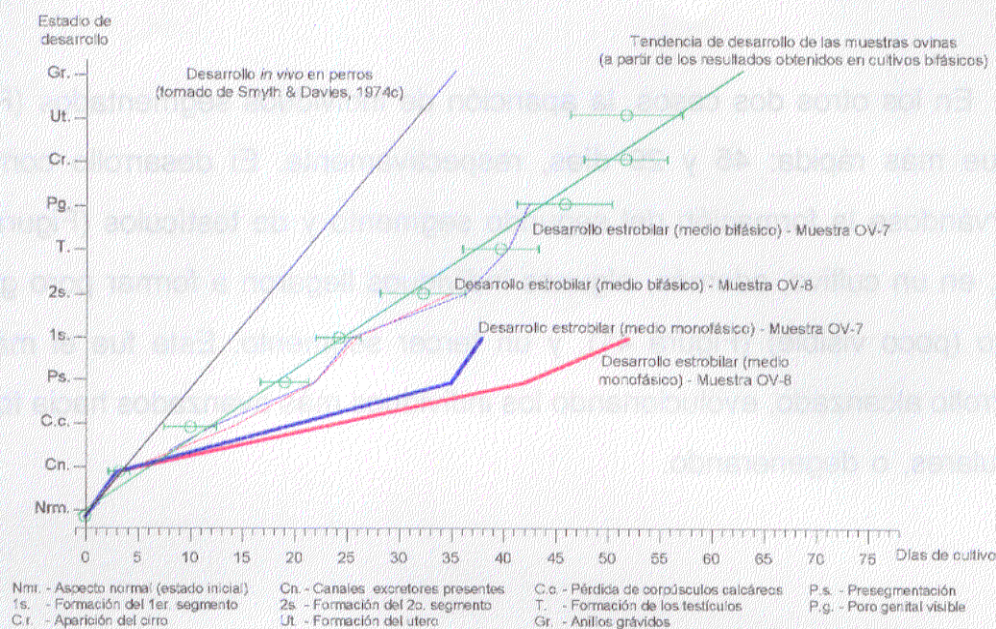
En estos cultivos, el desarrollo vesicular se inició según lo observado en otras muestras suinas: inicio de vesiculización entre los días 1-3, y formación de premicroquistes entre los días 6-10. En una de las experiencias se formaron microquistes entre los 10-12 días; en las otras dos, sin embargo, dicha formación se demoró hasta los 43 y 78 días, respectivamente (Gráfica 11).

El desarrollo estrobilar (Gráfica 10) se inició de forma similar en todos los cultivos: varios protoescólices empezaron a crecer y perder los corpúsculos calcáreos, a los 6 días, alcanzando el estadio de presegmentación a los 18-20 días (Figura 37): En uno de los cultivos, así permanecieron hasta el día 73, en

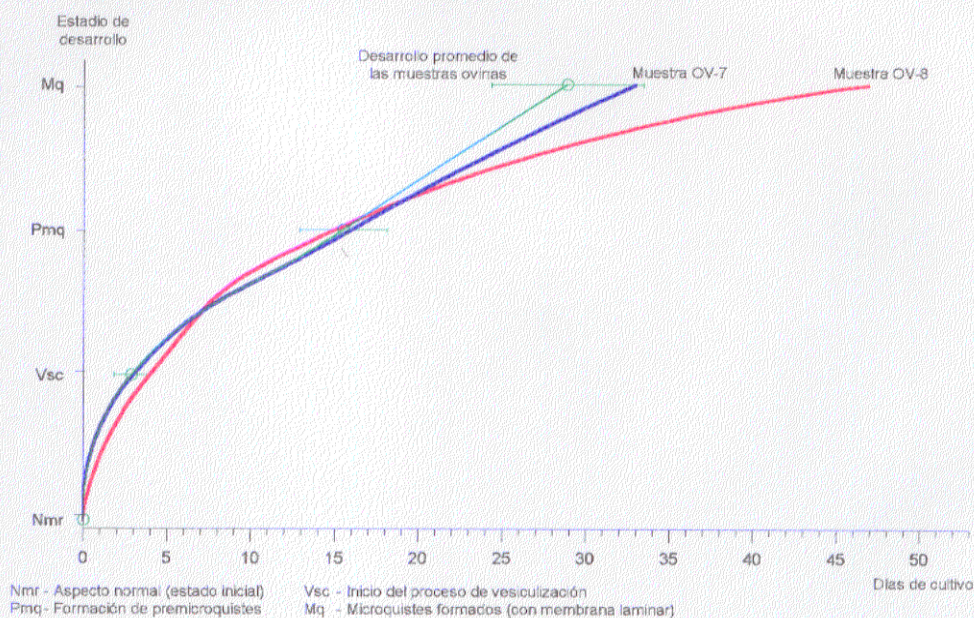
que un individuo formó el primer segmento. Poco después (día 80) este cultivo degeneró.

En los otros dos casos, la aparición de individuos segmentados (Figura 38) fue más rápida: 45 y 29 días, respectivamente. El desarrollo continuó, observándose la formación del segundo segmento y de testículos (Figuras 39 y 40); en un cultivo, además, algunos individuos llegaron a formar poro genital y cirro (poco visible) (Figura 41), y un tercer segmento. Este fue el máximo desarrollo alcanzado, evolucionando los individuos más avanzados hacia formas vesiculares, o degenerando.

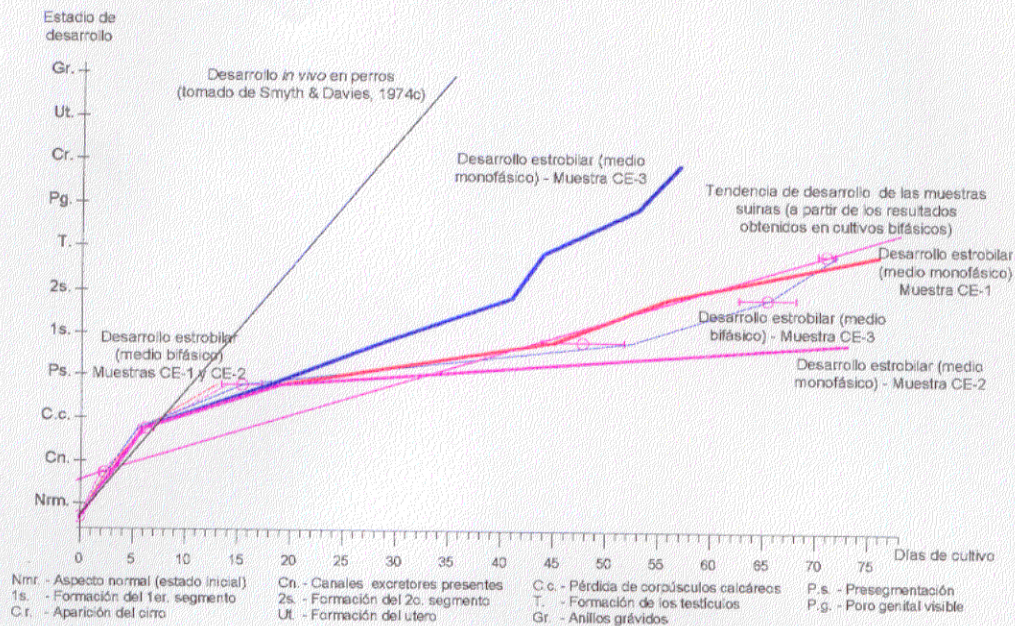
Gráfica 8 - Desarrollos estrobilares en cultivos monofásicos: evolución hacia adultos. Muestras de origen ovino.



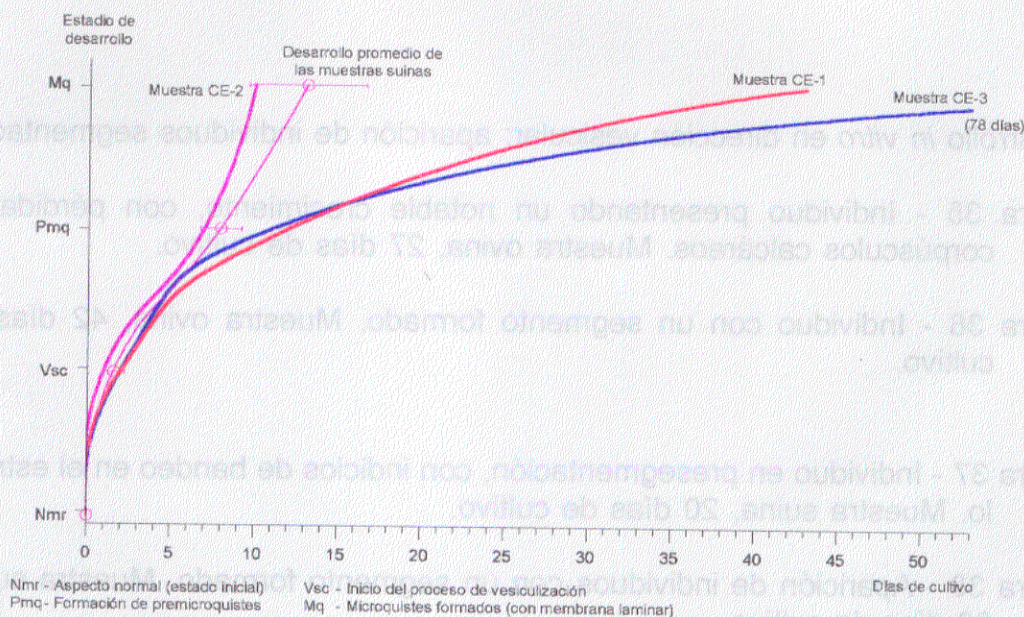
Gráfica 9 - Desarrollos estrobilares en cultivos monofásicos: evolución hacia microquistes. Muestras de origen ovino.



Gráfica 10 - Desarrollos estrobilares en cultivos monofásicos: evolución hacia adultos. Muestras de origen suino.



Gráfica 11 - Desarrollos estrobilares en cultivos monofásicos: evolución hacia microquistes. Muestras de origen suino.



ABRIR FIGURA 35

